

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Christian P. Speer, FRCPE

**Der Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf
T-Zellsubpopulationen bei gesunden Probanden und
Patienten mit rheumatischen Erkrankungen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von:

Maximilian Riekert

aus Stuttgart

Würzburg, August 2017

Referent/Referentin: Prof. Dr. med. Martina Prelog

Korreferent/Korreferentin: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2018

Der Promovend ist Arzt und Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Autoimmunität und rheumatische Erkrankungen	1
1.1.1.	Rheumatoide Arthritis	5
1.1.2.	Ankylosierende Spondylitis.....	10
1.1.3.	Systemischer Lupus erythematodes	12
1.1.4.	Mesenchymale Stammzellen	15
2.	Ziele der Arbeit	19
3.	Material und Methoden	21
3.1.	Material	21
3.1.1.	Reagenzien Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung	21
3.1.2.	Pufferlösungen, Zellkultur-, Nähr- und Trennmedien.....	23
3.1.3.	Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien	26
3.2.	Methoden	29
3.2.1.	Ethische Voraussetzungen	29
3.2.2.	Patienten	30
3.2.3.	Gesunde Probanden	31
3.2.4.	MSC-Spender	32
3.2.5.	Zellkultur und Polarisierung.....	33
3.2.5.1.	Ficoll Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMC.....	33
3.2.5.2.	Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer	34
3.2.5.3.	Auftau- und Einfrierverfahren	35
3.2.5.4.	Kultivierung mesenchymaler Stammzellen	36
3.2.5.5.	Magnetic Activated Cell Sorting (MACS®)	36
3.2.5.6.	Co-Kultur MSC und T-Zellen	40
3.2.5.7.	T-Zell-Polarisierung.....	43
3.2.5.8.	DNA/RNA Präparation	44
3.2.6.	Flowzytometrie	45
3.2.6.1.	Überblick	45
3.2.6.2.	Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung.....	47
3.2.6.3.	Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung	49
3.2.6.4.	Proliferations- und Apoptose-Färbung.....	50
3.2.7.	Statistik	51
4.	Ergebnisse	53
4.1.	Etablierungsversuche.....	54
4.1.1.	Etablierungsversuchsreihe 1: Co-Kultur Naive CD4 ⁺ T-Zellen und MSCs	54
4.1.2.	Etablierungsversuchsreihe 2: Co-Kultur Naive CD4 ⁺ T-Zellen und MSCs + APCs	58
4.1.3.	Etablierungsversuchsreihe 3: Co-Kultur und Transwell®-Experimente	61
4.1.4.	Zusammenfassung der Etablierungsversuche	68
4.2.	Charakteristik Patienten, gesunde Probanden und MSC-Spender	71
4.2.1.	Patienten	71
4.2.2.	Gesunde Kontrollprobanden	73
4.2.3.	MSC-Spender	74
4.3.	Modulation des Phänotyps durch MSCs	74
4.3.1.	Modulation des Phänotyps Naiver CD4 ⁺ T-Zellen.....	74
4.3.2.	Modulation des Phänotyps Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen	77
4.3.3.	Zusammenfassung Phänotypisierung.....	78

4.4.	Proliferation und Apoptose Naiver und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen	79
4.4.1.	Proliferation	79
4.4.2.	Apoptose.....	83
4.5.	Zytokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression	86
4.5.1.	Zytokinproduktion in der Naiven Zellfraktion	86
4.5.2.	Chemokinrezeptorexpression in der Naiven Zellfraktion	95
4.5.3.	Zytokinproduktion in der Nicht-Naiven Zellfraktion.....	97
4.5.4.	Chemokinrezeptorexpression in der Nicht-Naiven Zellfraktion	105
4.5.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	107
5.	Diskussion	109
5.1.	Funktionale T-Zellsubpopulationen und MSCs	109
5.2.	Beeinflussung von Proliferation und Apoptose durch MSCs	112
5.3.	Zytokinproduktion	116
5.3.1.	Interferon gamma (IFN γ)	116
5.3.2.	Interleukin 17 (IL-17)	117
5.3.3.	Interleukin 9 (IL-9)	119
5.3.4.	Interleukin 13 (IL-13)	120
5.3.5.	Interleukin 10 (IL-10)	121
5.3.6.	CCR5-, CCR6- und CXCR3-Expression	122
6.	Zusammenfassung	125
7.	Literaturverzeichnis	128
8.	Abkürzungsverzeichnis	141
9.	Abbildungsverzeichnis	144
10.	Tabellenverzeichnis	147
11.	Anhang	151

1. Einleitung

1.1. Autoimmunität und rheumatische Erkrankungen

Unser Immunsystem entwickelte sich, um uns gegen eindringende Pathogene zu schützen und uns bei der Heilung verletzten Gewebes zu helfen [1].

Frühe angeborene Abwehrsysteme beruhen auf unveränderlichen Rezeptoren, die allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern erkennen. Diese sind von entscheidender Bedeutung, werden jedoch von vielen Pathogenen überwunden und können kein immunologisches Gedächtnis entwickeln. Das Erkennen eines bestimmten Krankheitserregers und die Entwicklung eines verbesserten Schutzes vor erneuter Infektion ist eine einzigartige Eigenschaft der adaptiven Immunität. Bekannt sind zwei Haupttypen von Lymphozyten: B-Lymphozyten, die im Knochenmark reifen und Ursprung von zirkulierenden Antikörper sind, und T-Lymphozyten, die im Thymus reifen und Peptide von Krankheitserregern erkennen, die von MHC-Molekülen auf infizierten oder antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden [2].

Die Expression von CD4 oder CD8 definiert zwei verschiedene T-Zell Linien, die sich beide in ihrer MHC Spezifität und ihrer Funktion unterscheiden. Die meisten CD4⁺ T-Zellen sind auf die MHC Klasse II restringiert und fungieren in aktiviertem Zustand als T-Helfer (T_H) Zellen. Dabei unterstützen sie effektorische Komponenten wie B-Zellen in der Zytokinsekretion und verstärken die Expression spezifischer Membranliganden. Im Gegensatz dazu beschränken sich CD8⁺ T-Zellen auf die MHC-Klasse I und erlangen nach ihrer Aktivierung zytotoxische Eigenschaften, die ihnen erlauben Zellen zu töten, die ihr Zielantigen exprimieren [3].

Nachdem CD4⁺ T-Zellen 1986 anhand ihres Zytokinprofils durch Mosmann et al. [4] am Mausmodell weiter in Th1- und Th2-Zellen differenziert wurden, konnten in den vergangenen Jahren regulatorische T-Zellen (Tregs), induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs), folliculäre T-Helferzellen (Tfh), Th17-Zellen, Th9-Zellen und weitere T-Zell Subpopulationen voneinander abgegrenzt werden (siehe Abbildung 1)[5, 6].

Die Differenzierung Naiver CD4⁺ T-Zellen in verschiedene T-Helfersubpopulationen wird größtenteils nach Interaktion mit dendritischen Zellen in den lymphatischen Organen festgelegt, wobei die Zytokine IL-12, IL-23 und TGF- β eine tragende Rolle in frühen Phasen der Dif-

ferenzierung von humanen T-Helferzellen spielen [7]. Die Mehrheit reifer peripherer $CD4^+$ T-Zellen befindet sich in der Ruhephase und lässt sich in die beiden Subpopulationen Naive und Gedächtnis-T-Zellen unterteilen, abhängig davon, ob die jeweilige T-Zelle Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatte oder nicht [8].

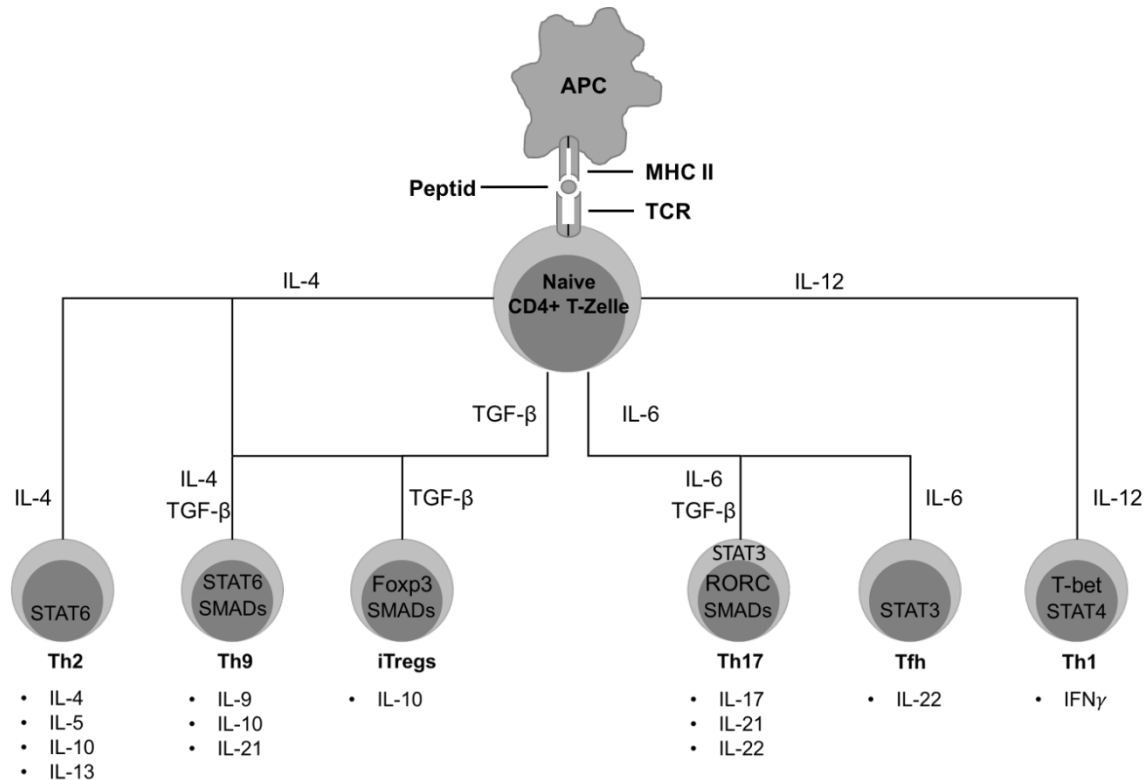


Abbildung 1

Einfluss des Zytokinmilieus auf die Differenzierung von T-Helferzellen (modifiziert nach [9]). Antigenpräsentierende Zellen (APCs) können Peptidbruchstücke phagozytierter Erreger, über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren. Mittels T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennen Naive $CD4^+$ T-Zellen die Peptidbruchstücke und differenzieren sich im Wesentlichen durch das umgebende Zytokinmilieu. Für die einzelnen T-Helferzellpopulationen (Th2, Th9, iTregs, Th17, Tfh, Th1) sind neben den zugehörigen Signalwegen (STATs, Smads) auch die produzierten Zytokine und die Transkriptionsfaktoren FoxP3, T-bet und RORC dargestellt.

Eine Quervernetzung des T-Zell Rezeptors ist erforderlich, um die Proliferation von Gedächtnis-Zellen zu induzieren. Für die Proliferationsaktivierung Naiver T-Zellen sind zusätzlich Signale antigenpräsentierender Zellen (APC) notwendig [10]. Das Oberflächenantigen CD45 wird auch als Leukocyte Common Antigen (LCA) bezeichnet und besitzt mehrere Isoformen. Dalchau und Fabre [11] wiesen darauf hin, dass monoklonale Antikörper, die mit verschiedenen Leukozytenpopulationen interagierten, eigentlich verschiedene Determinanten des desselben Moleküls detektierten. Sie folgerten aus ihren Beobachtungen, dass das Leukocyte Common „Antigen“ oder „Molekül“ nicht als einzelne, diskrete Entität betrachtet werden

sollte, sondern als eine Familie strukturell verbundener Moleküle, möglicherweise mit verschiedenen Funktionen.

Durch die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene und ihrer Isotypen lassen sich T-Zellen in einzelne Subpopulationen einteilen. Zu den am häufigsten verwendeten Oberflächenmarkern zählen CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27 und CD28. Neben der präzisen Identifikation $CD45RA^+CCR7^+CD27^+CD28^+$ Naiver T-Zellen, erlaubt die differenzierte Expression dieser vier Oberflächenmoleküle die Unterscheidung zwischen zahlreichen Subpopulationen ruhender Antigen-erfahrener T-Zellen. Da die Verwendung von CCR7 als Marker zur T-Zell-Differenzierung unter bestimmten Umständen Schwierigkeiten bereitet, wie etwa bei gefrorenen Proben, wird die Verwendung der Marker CD28 oder CD27 empfohlen [12, 13].

Nach vorangegangener in vivo Stimulation mit Antigenen, konnte unter aktivierten $CD4^+$ T-Gedächtniszellen eine Subpopulation $CD45RA^-$ T-Zellen abgegrenzt werden, die durch das Fehlen des Oberflächenantigen CD27 charakterisiert ist [14]. Diese Erkenntnisse deuten unter anderem darauf hin, dass es im Zuge der T-Zell-Differenzierung zu einem progredienten Verlust von entscheidenden Oberflächenmolekülen kommt. Die Differenzierung beginnt bei $CD45RA^+CD27^+$ Naiven T-Zellen und setzt sich über $CD45RA^-CD27^+$ zentrale Gedächtnis-T-Zellen bis hin zu $CD45RA^-CD27^-$ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen fort. Terminal differenzierte T-Effektor Gedächtniszellen (TEMRA) zeigen eine Ausnahme und reexprimieren CD45RA [13, 15]. Das Prinzip verschiedener T-Helferzell-Linien war ein nützliches Paradigma für die Konzeptualisierung der $CD4^+$ T-Zell-Differenzierung. In vitro gibt es mittlerweile vermehrt Anzeichen dafür, dass $CD4^+$ T-Zell-Populationen den Umfang ihrer Zytokinproduktion verändern können [16].

In Experimenten an einem in vitro Modell demonstrierten Perez et al. [17] die Induktion der Th2 Differenzierung von IFN γ -produzierenden Th1 Zellen durch IL-4. Sie erklärten ihre Beobachtungen einerseits durch eine Veränderung des Zytokinexpressionsmusters der Th1-Zellen, bedingt durch IL-4, andererseits durch nicht geprägte Vorläuferzellen innerhalb der Th1 Population. Während ihrer Differenzierung scheinen Th1 Zellen eine Phase zu durchlaufen, in der die Zytokinproduktion vom externen Zytokinmilieu abhängig ist, um im Verlauf ihren endgültigen Phänotyp zu entwickeln. Harrington et al. [18] konnten den Nachweis erbringen, dass sich IL-23-induzierte, IL-17-produzierende $CD4^+$ Effektor-T-Zellen entlang eines verschiedenen Entwicklungsprozess differenzieren, welcher sich früh von dem der Th1- und Th2-Zelllinien unterscheidet und durch die von Th1- und Th2-Zellen produzierten Zytokine IL-

4 und IFN γ potenziell antagonisieren lässt. Das von aktivierten CD4⁺ T-Zellen produzierte IL-17 stimuliert Stromazellen, die in der Folge verschiedene Zytokine, inklusive IL-6 und Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) bilden. Anschließend kommt es insbesondere zur Hämatopoese von neutrophilen Granulozyten [19].

Darüber hinaus sind epigenetische Modifikationen spezifischer Gene, die für Zytokine oder wesentliche Transkriptionsregulatoren codieren, an der T-Zell-Differenzierung beteiligt [20]. Die Resultate von Koenen et al. [21] zeigen, dass sich humane CD45RA⁻ Tregs in IL-17-produzierende T-Zellen differenzieren können und somit eine gesteigerte Plastizität aufweisen, die durch Zytokine des lokalen Mikromilieus und epigenetisches Remodeling kontrolliert wird.

Bereits angesprochen, inhibieren Th1- und Th2-Zellen durch IL-12, IL-4 und IFN γ die Expansion IL-17 exprimierender Zellen. Diese schützende Strategie kann als Feinregulierung aufgefasst werden und verhindert eine übermäßige Inflammation. Eine balancierte Differenzierung von T-Helferzellen ist entscheidend für die Immunität und den Schutz des Wirtes. Eine fehlerhafte Expression der Th1- und Th2-Zytokine beeinflusst die IL-17-Expression und trägt im Gegenzug möglicherweise zu einer Immunerkrankung bei [22].

Die Plastizität von T-Helferzellen in Bezug auf die Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren bietet die Möglichkeit der therapeutischen Intervention bei immunvermittelten Erkrankungen. Zum Beispiel könnten allergen-spezifische Th2-Zellen bei Asthmatikern in vivo verändert werden, um die Erkrankung zu unterbrechen. Entsprechend ließe sich bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) oder dem Morbus Crohn die Umwandlung von Th17-Zellen in Richtung Th1-Zellen durch die Verwendung von Medikamenten blockieren, die gegen spezifische, bei der Umwandlung involvierte Zytokine gerichtet sind [23].

Bei systemischen Autoimmunerkrankungen sind Mechanismen, die die Balance zwischen der Pathogenerkennung und der Vermeidung des Angriffs auf körpereigene Strukturen regulieren, gestört. Damit geht die Kontrolle über die Entzündungsreaktion verloren und resultiert in einer kontinuierlichen Aktivierung des Immunsystems ohne offenkundige Infektion [1].

In die Pathogenese bei Autoimmunerkrankungen sind häufig autoreaktive T-Helferzellen involviert, die durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine eine Entzündung initiieren und gleichzeitig autoreaktive B-Zellen unterstützen, die nach Reifung und Expansion Autoantikörper produzieren und zur Inflammation und Gewebeerstörung beitragen [24].

Autoimmunerkrankungen umfassen eine ganze Reihe organspezifische und systemische Störungen mit Multi-Organ-Beteiligung. Störungen die hauptsächlich, aber nicht ausschließlich Gelenke und Muskeln betreffen, werden unter Autoimmunerkrankungen des rheumatischen Formenkreises zusammengefasst und schließen unter anderem die rheumatoide Arthritis, den systemischen Lupus erythematoses, das primäre Sjögren's Syndrom, die systemische Sklerose, die idiopathische inflammatorische Myositis und die systemischen Vaskulitiden ein [25].

1.1.1. Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die hauptsächlich die Synovialmembran, den Knorpel und den Knochen betrifft. Die Erkrankung kann zu körperlichen Behinderungen und in manchen Fällen zu systemischen Komplikationen mit kardiovaskulären und pulmonalen Funktionsstörungen führen [26, 27].

Die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis liegt in vielen Populationen konstant bei 0,5-1,0%, kann jedoch in einzelnen Bevölkerungsgruppen auch variieren [28]. In einer Studie von Del Puente et al. [29] wurde die Prävalenz der RA bei Pima Indianern zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht und mit der Prävalenz japanischer und nordamerikanischer Bevölkerungsgruppen verglichen. Während die alters- und geschlechtsangepasste Prävalenz der Pima Indianer bei 5,30% lag, betrug sie in Teilen der japanischen Bevölkerung 0,47% und in Teilen der nordamerikanischen Bevölkerung 1,16%.

Die Pathogenese der RA ist auf eine komplexe Interaktion zwischen genetischen Faktoren und Umweltfaktoren zurückzuführen, sowie einer wiederholten Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Diese führt letztlich neben dem Zusammenbruch der Immuntoleranz, zur fälschlichen Präsentation von Autoantigenen und antigenspezifischer B- und T-Zell-Aktivierung [27].

Der genetische Einfluss auf die RA wurde anhand der Konkordanzraten monozygoter und dizygoter Zwillinge in einer landesweiten Studie von Silman et al. [30] 1993 untersucht. Die Resultate zeigen einen signifikanten Anstieg des RA Risikos monozygoter gegenüber dizygoter Paare und sprechen für eine genetische Komponente der Erkrankung. Wie bei anderen komplexen Erkrankungen haben auch genomweite Assoziationsstudien einen wichtigen Beitrag zum heutigen Verständnis der Ätiologie der RA geleistet [31].

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex, MHC) ist auf Chromosom 6 lokalisiert und beinhaltet eine Reihe an polymorphen Genen, die für die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Glykoproteine der Zelloberfläche kodieren, dessen Funktion in der Präsentation von Peptidantigenen gegenüber CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen liegt [32, 33].

Bei Menschen werden diese Gene Humane Leukozytenantigene genannt, oder HLA-Gene, da sie zuerst durch antigenische Unterschiede zwischen Leukozyten verschiedener Individuen entdeckt wurden [34]. Bei der Aufklärung des Erbmechanismus der RA lag der Hauptfokus auf der Identifikation von Genen der MHC-Klasse-II-Region inklusive der Gen-Region HLA-D [32, 35]. Stastny [36] untersuchte 80 Patienten weißer Hautfarbe mit diagnostizierter erosiver RA und fand das B-Zell Alloantigen HLA-DRw4 bei 70% der untersuchten Patienten, während es in der Kontrollgruppe nur bei 28% der gesunden Probanden nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die RA mit Genen der HLA-D Region assoziiert ist und dass immunogenetische Faktoren eine Rolle in der Pathogenese der RA spielen.

Auch viele infektiöse Agenzien wie das Epstein-Barr-Virus oder das Parvovirus, werden mit der Pathogenese von RA in Verbindung gebracht, obwohl man nicht sicher weiß wie die Erkrankung letztendlich ausgelöst wird. Ein möglicher Mechanismus, wie infektiöse Agenzien und andere Umweltfaktoren an der Auslösung der Autoreaktivität beteiligt sein könnten, basiert auf der Theorie der molekularen Mimikry [37].

Die Gelenkschwellung bei RA reflektiert die Inflammation der Synovialmembran, als Konsequenz einer Aktivierung des Immunsystems und ist durch die Leukozyteninfiltration in das normalerweise spärlich besiedelte synoviale Kompartement gekennzeichnet [38].

Über verschiedene Adhäsionsmoleküle, die sich auf der Oberfläche von Endothelzellen befinden, gelangen Leukozyten in die synoviale Membran. Mehrere Zelltypen, vor allem dendritische Zellen, exprimieren Pattern-Recognition-Moleküle wie Toll-like Rezeptoren, die diverse fremde und körpereigene Strukturen, im Rahmen ihrer angeborenen Immunantwort binden und im aktivierten Zustand auf Zellen des adaptiven Immunsystems wirken [39].

Bereits 1981 wurde die Hypothese aufgestellt, RA sei eine Erkrankung der Immunregulation zwischen T-Lymphozyten und Makrophagen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden Arthritis-assoziierte Antigene, durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie etwa dendritische Zellen, Makrophagen oder aktivierte B-Zellen, T-Zellen präsentiert [40].

Die an der RA beteiligten Zytokine lassen sich grob in funktionelle Gruppen einteilen. IL-2, IL-3, IL-4 und IFN γ sind die Produkte von T-Zellen und die meisten ihrer bis jetzt bekannten

Funktionen werden mit der Aktivierung und Amplifikation der zellulären und humoralen Immunantwort in Verbindung gebracht.

IL-1, IL-6, koloniestimulierender Faktor 1 (CSF-1), und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) werden primär von Makrophagen und Fibroblasten synthetisiert. Die genannten Zytokine haben vielfältige Effekte, die zu Zellproliferation, erhöhter Prostaglandin- und Matrix-degradierender Proteaseaktivität, Fieber und der Resorption von Knochen führen [41].

Beim gesunden Menschen sezernieren Th1 Zellen IFN γ und verteidigen sich damit gegen intrazelluläre Bakterien. IL-4 sezernierende Th2 Zellen greifen extrazelluläre Bakterien wie zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae* an und regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine Rolle in Hinblick auf die Immuntoleranz und der Modulation einer bestehenden Immunantwort [42].

Th1 dominante Immunantworten sind häufig mit Entzündung und Gewebeverletzungen assoziiert, da die Zytokine TNF- β und IFN γ inflammatorische Leukozyten rekrutieren und aktivieren. Bedeutende Zytokine der Th2 Zellen sind IL-4 und IL-5 [43]. Die Differenzierung Naiver T-Zellen in Th17 Zellen resultiert in der Produktion von IL-17, welches direkt mit Synovialzellen interagiert und in Kombination mit Signalmolekülen von Monozyten zu einem gesteigerten proinflammatorischen Sekretionsprofil führt. Um die Rolle von IL-17 bei der Pathogenese der RA zu klären, untersuchten Chabaud et al. [44, 45] die Produktion von IL-17 durch synoviales Gewebe ex vivo. Synoviales Gewebe von Patienten mit RA zeigte gegenüber synovialen Gewebe von Patienten mit Osteoarthritis erhöhte IL-17-Produktion. Die Produktion ließ sich durch IL-4 und IL-13 herunterregulieren. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass IL-17 zum charakteristischen Entzündungsgeschehen der RA beiträgt [46].

Erhöhte Krankheitsaktivität der RA wird mit einem positiven Rheumafaktor in Verbindung gebracht. Dagegen scheinen positive Antikörper gegen citrullinierte Proteine (Anti-Citrullinierte-Peptid-Antikörper, ACPA) nicht, oder sogar mit niedrigerer Krankheitsaktivität assoziiert zu sein. Etwa 80% der RA Patienten weisen einen positiven Rheumafaktor auf [47, 48]. Auf der Suche nach spezifischen Autoantikörpern für RA nutzten Schellekens et al. [49] verschiedene, citrullinhaltige Peptidvarianten im ELISA-Verfahren und konnten bei 76% der untersuchten RA Seren Antikörper mit einer Spezifität von 96% finden. Die Spezifität und das Auftreten dieser Antikörper in frühen Phasen der Erkrankung deuteten auf eine mögliche Rolle citrullinhaltiger Epitope in der Pathogenese der RA hin. Nielsen et al. [50] zeigten, dass bei ungefähr der Hälfte der Patienten mit RA spezifische serologische Auffälligkeiten mehrere Jahre vor Symptombeginn gemessen werden konnten. Sie beschrieben ein hohes Risiko

für die Entwicklung einer RA bei Individuen, die erhöhte Spiegel des IgM-Rheumafaktors (IgM-RF) und des Antikörpers gegen antizyklische citrullinierte Peptide (ACCP) aufwiesen. ACPA erkennen multiple citrullinierte Proteine und werden aktuell in der Diagnosefindung und als Prognosefaktor genutzt [51, 52].

Durch die Parameter Schwellung/Druckschmerz der Gelenke, Serologie, Akute-Phase-Reaktion und Dauer der Symptome, lässt sich die RA anhand der American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) Kriterien von 2010 definieren [53].

Die „definitive RA“ basiert auf einer bestätigten Synovitis in mindestens einem Gelenk, dem Fehlen einer alternativen Diagnose, die für die Synovitis in Frage kommt, das Erreichen einer Gesamtpunktzahl von 6 oder mehr, bei einer maximalen Punktzahl von 10, durch die einzelnen Punktzahlen folgender vier Domänen: Anzahl und Ort der involvierten Gelenke (Punktzahl 0-5), serologische Auffälligkeiten (Punktzahl 0-3), erhöhte Werte der Akute-Phase-Reaktion (Punktzahl 0-1) und die Symptombdauer (Zwei Level; Punktzahl 0-1) [53].

Da die Krankheitsaktivität der RA nicht durch eine einzelne Variable gemessen werden kann, wurde anhand von zwei unterschiedlich schwer betroffenen Patientengruppen ein Score entwickelt, der die Parameter Ritchie Index, geschwollene Gelenke, Blutsenkungsindex und den Allgemeinzustand des Patienten berücksichtigt. Der Disease Activity Score 28 (DAS28) ist eine Weiterentwicklung des Disease Activity Score (DAS). Für die Bestimmung des nach Prevoo et al. [54] entwickelten DAS28 werden 28 Gelenke des Körpers auf Druckschmerzhaftigkeit und Schwellung untersucht [55]. Die Kombination aus Blutsenkungsgeschwindigkeit und C-reaktivem Protein gewährt nützliche diagnostische Informationen, die bei Bestimmung eines der beiden Parameter häufig nicht ersichtlich sind [56].

Für viele Erkrankungen wie Bluthochdruck oder Diabetes konnte eine zielgerichtete Behandlung (Treat to target) eine Reduktion des Risikos von Organschäden bewirken. Ein Arbeitskreis bestehend aus Rheumatologen und RA Patienten entwickelte ab 2008 Therapievor schläge um ein optimales therapeutisches Ergebnis der RA zu erzielen [57]. Die traditionelle Behandlung der RA beruht auf Glukokortikoiden, krankheitsmodifizierenden Antirheumatika (DMARDs) und nicht steroidal Antirheumatika (NSAR) [39].

DMARDs sind gegen die Inflammation gerichtet und müssen per Definition das Fortschreiten struktureller Schäden reduzieren. Obwohl NSAR Schmerzen und Gelenksteife reduzieren und

die körperliche Funktion verbessern, greifen sie nicht in den Prozess der Gelenkzerstörung ein und sind deshalb nicht krankheitsmodifizierend [38].

Zur Behandlung der RA wurde der Einsatz von Prednisolon mit dem Einsatz von Aspirin und weiteren Analgetika verglichen. Die Anwendung von Prednisolon anstelle von, oder zusätzlich zu Analgetika, wie Aspirin zeigte über einen Zeitverlauf von zwei Jahren durchschnittlich bessere funktionelle Kapazität, generelles Wohlbefinden und eine reduzierte Inzidenz erosiver Gelenkzerstörung [58].

Auch wenn Glukokortikoide in niedriger Dosis eingesetzt werden, konnte jedoch gezeigt werden, dass sie mit der Entwicklung spezifischer Nebenwirkungen, wie Frakturen, schweren Infektionen und gastrointestinalen Beschwerden korrelieren [59].

Neben modernen zielgerichteten Therapieverfahren mit Biologika bleibt Methotrexat (MTX) das initial bevorzugte Medikament in der Therapie der RA. Darüber hinaus hat die kombinierte Applikation von Methotrexat und biologischen DMARDs die Behandlung von RA revolutioniert [60, 61]. Bereits vor mehr als 20 Jahren erkannten Elliot et al. [62] die effektive Wirkung chimärer monoklonaler Antikörper zur Behandlung der RA.

Die stetige Identifikation von Signalwegen in der Pathogenese der RA hat zur Entwicklung einer Vielzahl von biologischen Agenzien zur RA Therapie beigetragen. Durch Monoklonale Antikörper und Fusionsproteine werden Zytokine inhibiert, Signalrezeptoren blockiert und die T-Zell Kostimulation verhindert. TNF kann durch Adalimumab, Certolizumab pegol, Etanercept, Golimumab und Infliximab gehemmt werden. Tocilizumab ist gegen den Rezeptor von IL-6 gerichtet und Abatacept ist ein Fusionsprotein, dass die Kostimulation von T-Zellen hemmt [38].

Ein Teilaspekt der RA Therapie ist die B-Zell-Depletion. In einer multizentrischen, randomisierten, doppelverblindeten, kontrollierten Studie wurde die Effektivität der B-Zell gerichteten Therapie mit Rituximab, einem anti-CD20 Antikörper, bei Patienten mit RA untersucht. Durch die Behandlung mit Rituximab allein oder in Kombination mit Cyclophosphamid oder Methotrexat konnte eine signifikante Verbesserung der Krankheitssymptome erzielt werden [63]. Die Ergebnisse von Hamel et al. [64] demonstrieren, dass die Therapie durch B-Zell Depletion während der Entwicklung einer Arthritis die autoreaktive T-Zell Antwort unterdrückt. Aktuelle Therapeutika wie Tofacitinib gehören zu den Januskinase-Inhibitoren. Januskinasen werden bei RA Patienten mit einem erhöhten Auftreten phosphotyrosinhaltiger

Proteine in Synovialzellen in Verbindung gebracht, die für das hoch destruktive tumor-ähnliche Verhalten des synovialen Bindegewebes verantwortlich sein könnten [65].

Die aktuelle Therapie der RA basiert auf der Verminderung der Immunantwort und der Behandlung der Folgen, einer unkontrollierten Inflammation und Destruktion der Gelenke. Im Zuge neuer Therapieansätze steht die Ursachen gerichtete und kurative Behandlung der RA im Mittelpunkt. Neben der Therapie mit Biologika und intrazellulären Signalinhibitoren, liegt ein weiterer zentraler Forschungsaspekt auf zellulären Therapieformen. Als Beispiele dienen der Transfer tolerogener dendritischer Zellen, die Aktivierung regulatorischer T-Zellen oder die Applikation von Stammzellen [38, 66]. In mehreren Arbeiten konnte der immunmodulierende und immunsuppressive Charakter von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in proinflammatorischer Umgebung nachgewiesen werden. Darüber hinaus ließen sich positive Effekte in Bezug auf die Geweberegeneration zerstörter Gelenke beobachten und die Induktion regulatorischer T-Zellen [67-75].

1.1.2. Ankylosierende Spondylitis

Die Ankylosierende Spondylitis (AS) ist eine häufige inflammatorische, rheumatische Erkrankung, die das Achsenskelett befällt und charakteristische Rückenschmerzen verursacht. Sie kann zu strukturellen und funktionellen Einschränkungen sowie zur Minderung der Lebensqualität führen [76]. Das durchschnittliche Alter zu Erkrankungsbeginn liegt bei HLA-B27 negativen Individuen nach Feldtkeller et al. [77] bei 27,7 Jahren und bei HLA-B27 positiven Individuen bei 24,8 Jahren. Die Prävalenz der Spondylarthritis reicht von 0,2% in Südostasien bis 1,6% in nördlich-arktischen Gemeinden [78]. Blécourt et al. [79] vermuteten 1961, dass die AS in einen nicht geschlechtsgekoppelten dominanten Erbmechanismus mit unterschiedlicher Penetranz zwischen Männern und Frauen involviert sei. Pedersen et al. [80] konnten anhand von Zwillingsstudien von einem bedeutenden genetischen Einfluss in der Pathogenese der AS ausgehen. Der Risikofaktor HLA-B27, ein MHC-Klasse-I-Molekül, der ungefähr 150 bekannten Subtypen einschließt, ist der am häufigsten untersuchte Risikofaktor von AS [81, 82]. Er ist zu einem Prozentsatz von über 90% mit AS assoziiert. Trotzdem entwickeln nur 5-6% HLA-B27 positive Individuen der weißen Bevölkerung eine AS [82-84]. Heute sind weitere, überexprimierte Genabschnitte bekannt, die unter anderem eine Rolle bei der Differenzierung von Th17 Zellen spielen [85].

Faktoren die letztlich zur Auslösung der Erkrankung führen, sind nicht bekannt. Bakterielle Infektionen mit Chlamydia trachomatis, Yersinien, Salmonellen, Shigellen und Campylobacter jejuni werden als mögliche Auslöser diskutiert [86].

Verglichen mit dem Cys67 Modell, einem alternativen Krankheitsmodell der AS, welches auf einem nicht-gepaarten Cystein an Position 67 des HLA-B27-Moleküls beruht, geht das arthritogene Peptidmodell von einer durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort gegenüber Peptiden aus, die lediglich im Gewebe von Gelenken vorkommen und die speziell von HLA-B27 Subtypen gebunden und präsentiert werden [87]. Bei der immunhistologischen Untersuchung einer Sakroiliitis, bei Patienten mit AS, erkannten Braun et al [88] Pannus-ähnliche zelluläre Infiltrate in den Sakroiliakalgelenken der untersuchten Patienten. Die Infiltrate enthielten CD14⁺ Makrophagen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie vermehrt TNF α mRNA. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollen, konnten Shen et al. [89] eine erhöhte Frequenz IL-17 positiver CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit AS und RA feststellen. Parallel dazu konnte bei AS und RA Patienten eine erhöhte Sekretion von IL-17 gemessen werden. Ein signifikanter Anteil IL-17 produzierender Zellen, produzierte auch IL-22 und IFN γ . Die Diagnose der AS lässt sich anhand von Anamnese und ESSG-Kriterien stellen. Weiterhin geläufig sind auch die im Jahr 1984 modifizierten New York Kriterien [90, 91].

Zur Ermittlung der Symptome und des Krankheitsstatus der AS werden Ankylosing Disease Activity Score (ASDAS), Ankylosing Spondylitis Quality of Life Scale (ASQoL), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), Bath Ankylosing Spondylitis Global Score (BAS-G), Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), Dougados Functional Index (DFI) und Health Assessment Questionnaire for the Spondylarthropathies (HAQ-S) verwendet [92].

Über Jahrzehnte stellten körperliche Betätigung und NSAR die tragenden Säulen in der Therapie der AS dar. Bis vor kurzem herrschte ein Mangel an krankheitsmodifizierenden Behandlungsstrategien. Die aufkommende Therapie mit Biologika revolutioniert derzeit die Behandlung von AS, jedoch kann momentan wenig über Langzeitnutzen und Risiken dieser Behandlung gesagt werden [93].

Konventionelle DMARDs sind in der Behandlung axialer Symptome nicht effektiv und Glukokortikoide werden zeitlich begrenzt bei schweren Schüben eingesetzt [94]. Obwohl TNF-Inhibitoren wie Adalimumab, Etanercept, Golimumab oder Infliximab gezeigt haben, dass sie in der Behandlung von AS effektiv sind, sprechen 20-40% der Patienten nicht, oder nur in-

adäquat auf die Therapie an [95]. Darüber hinaus wird die Remissionsphase von vielen Patienten nicht erreicht und die in der Magnetresonanztomographie beurteilbare knöcherne Entzündung, kann nur bei ungefähr 70% der Patienten reduziert werden, sofern diese die Therapie fortsetzen [95].

Für Patienten die auf eine Therapie mit TNF-Inhibitoren nicht ansprechen, oder diese nicht tolerieren gibt es keine zugelassenen Therapiealternativen. Bereits angesprochen scheint IL-17 ein zentrales Zytokin in der Entwicklung der SA zu sein. In diesem Zusammenhang konnten Baeten et al. [94] durch die Blockade von IL-17 mittels monoklonaler Antikörper, eine signifikante und klinisch relevante Reduktion der Krankheitsaktivität beobachten.

Nicht nur in Hinblick auf die osteogene Differenzierung, sondern auch als möglicher Therapieansatz spielen MSCs eine Rolle in der Pathogenese der AS. In einer aktuellen Studie verglichen Xie et al. [96] die Expressionslevel von langer nicht kodierender RNA (lncRNA) und mRNA zwischen osteogen differenzierten MSCs von AS Patienten und gesunden Patienten und erforschten Mechanismen, die zur fehlerhaften osteogenen Differenzierung der MSC von AS Patienten führen. Letztlich konnten vier lncRNA identifiziert werden, die möglicherweise zur gestörten osteogenen Differenzierung der MSC von AS Patienten beitragen.

In einer weiteren aktuellen Studie untersuchten Li et al. [97] die immunregulatorischen Eigenschaften von All-Trans Retinsäure (ATRA) auf MSCs in der Behandlung von AS. MSCs aus dem Knochenmark gesunder Spender wurden mit ATRA vorbehandelt und mit PBMCs von AS Patienten co-kultiviert. ATRA vorbehandelte MSCs steigerten die IL-6-Produktion, während sie die Produktion von TNF α , IL-17 und IFN γ verminderten. IL-6 könnte demnach einen potentiell protektiven Faktor bei der Entwicklung der SA darstellen. Wu et al. [98] konnten ein reduziertes immunmodulatorisches Potential bei Knochenmarksstammzellen von AS Patienten feststellen, gleichzeitig war die Balance zwischen CCR4⁺CCR6⁺ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen gestört. Erste klinische Versuchsreihen bei AS Patienten, die nicht auf NSARs ansprechen, konnten einen Rückgang der Krankheitsaktivität registrieren, die sich auch in der MRT widerspiegelte [99].

1.1.3. Systemischer Lupus erythematodes

Der Systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine idiopathische Autoimmunerkrankung, die mit der Bildung von Autoantikörpern einhergeht [100]. Die Inzidenzraten liegen weltweit

zwischen 1 und 10 pro 100.000 Einwohner während die Prävalenzraten zwischen 20 und 70 pro 100.000 Einwohner liegen [101]. Inzidenz- und Prävalenzraten ethnischer Gruppen mit afro-karibischer oder afroamerikanischer Abstammung liegen teilweise beträchtlich höher [102]. SLE tritt bei Frauen im gebärfähigen Alter gehäuft auf [103]. Die Mechanismen die zur Förderung und Aufrechterhaltung dieser pathologischen Immunantwort führen, sind noch immer kaum bekannt [100]. SLE wird als multifaktorielle Erkrankung betrachtet die im Zusammenhang mit genetischer Disposition, Umweltfaktoren, Störungen der angeborenen und adaptiven Immunantwort steht [102]. Ein Verlust der Toleranz $CD4^+$ T-Zellen und B-Zellen gegenüber ubiquitären Autoantigenen und die folgende Produktion antinukleärer und anderer autoreaktiver Antikörper wird vermutet [104]. Für die in der Folge entstehende Gewebezerstörung bei SLE Patienten werden primär pathogene Antikörper verantwortlich gemacht [105]. Die vielfältige Ausprägung des systemischen Lupus erythematoses kann sich in Form eines Exanthems, einer Arthritis, einer Anämie und Thrombozytopenie, bis hin zur Serositis, Nephritis, Krampfanfall und zur Psychose manifestieren. Die signifikanteste immunpathologische Störung des SLE stellt die durch Immunkomplexablagerung vermittelte Glomerulonephritis dar [103]. Nach Rahman und Isenberg [105] sollte SLE daher Teil der Differentialdiagnose jedes Patienten sein, der eine dieser Manifestationen aufweist, weiblich ist und dessen Alter zwischen 15 und 50 Jahren liegt. Die Mehrheit der Patienten leidet an einer Mitbeteiligung der Haut [106]. Von der systemischen Form des Lupus erythematoses lassen sich kutane Formen abgrenzen, die heute anhand der klinischen Merkmale, der histologischen Veränderungen, der Laborwertveränderungen und der durchschnittlichen Dauer der Hautläsionen in vier verschiedene Kategorien unterteilt werden: Akut kutaner Lupus erythematoses (ACLE); subakut kutaner Lupus erythematoses (SCLE); intermittierender kutaner Lupus erythematoses (ICLE) und chronischer kutaner Lupus erythematoses, der die Formen chronisch diskoider Lupus erythematoses (CDLE) und den Lupus erythematoses profundus (LEP) einschließt [107].

Als Screening Untersuchung bei Verdacht auf SLE ist der Nachweis von Antikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) geeignet, der bei nahezu allen Patienten mit SLE positiv ist [108]. Die weitere Bestimmung von Komplementfaktor C_3 und C_4 , Antiphospholipidantikörper, Rheumafaktor, Urinstatus, Gesamteiweiß im 24-Stunden-Urin, Blutbild mit Differentialblutbild, Leberenzyme und Nierenfunktion gehören zur Labordiagnose des SLE [106].

Nach den SLE-Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) ist ein SLE wahrscheinlich, wenn mindestens vier der insgesamt 11 Klassifikationskriterien erfüllt sind. Zu den Kriterien zählen im Einzelnen: 1. Schmetterlingserythem; 2. diskoider Hautlupus; 3. Photosensitivität; 4. Schleimhautulzerationen in Mund und Nase; 5. Arthritis; 6. Nephritis; 7. Enzephalopathie; 8. Pleuritis oder Perikarditis; 9. Anämie, Leukopenie oder Thrombopenie; 10. Nachweis antinukleärer Antikörper; 11. Nachweis von Doppelstrang-DNA- oder Sm (Smith)-Antikörpern. Bei Stellung der Diagnose SLE beträgt die Sensitivität und Spezifität dieser Kriterien 96% [109, 110].

Aufgrund des heterogenen klinischen Erscheinungsbildes ist das Management von SLE komplex. Es mangelt an universell akzeptierten Methoden zur Messung der Krankheitsaktivität sowie an wirksamen, sicheren, spezifischen und zielgerichteten Therapien. Drei der am häufigsten verwendeten Medikamente in der Therapie des SLE sind Hydroxychloroquin, Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil. Cyclophosphamid wird ebenfalls verwendet, jedoch weniger häufig [111]. Konventionelle immunsuppressive Therapien konnten die Überlebensrate der Patienten mit SLE radikal verbessern, aber ihre Anwendung ist mit beträchtlicher Toxizität verbunden und ein wesentlicher Teil der Patienten bleibt therapierefraktär [112].

Folglich werden vermehrt biologische Therapeutika in der Behandlung des SLE eingesetzt. Diese haben den Vorteil zielgerichtet in Pfade einzugreifen, die zu einer Entzündungsreaktion beitragen. Mögliche Ansätze beinhalten neben der zytokingerichteten Therapie, die Intervention von T- und B-Zell Interaktionen, die B-Zell Depletion, die Induktion der Immuntoleranz und die Beeinträchtigung der Komplementaktivierung [113].

In Kontrast zu medikamentösen immunsuppressiven Therapien wurde ebenfalls versucht therapierefraktäre SLE Patienten mit allogenen MSCs zu behandeln. Sun et al. [114] therapierten in einer Studie vier Patienten mit MSCs, die unter Cyclophosphamid und Glukokortikoiden keinen Behandlungserfolg zeigten und konnten eine stabile Remissionsphase über einen Zeitraum von 12-18 Monaten beschreiben. Die Patienten profitierten von einer Verbesserung der Krankheitsaktivität, der serologischen Marker und der Nierenfunktion. Den protektiven Einfluss humaner MSCs auf die Nierenfunktion erkannten auch Tögel und Westenfelder [115], die eine effektive Verbesserung am experimentellen, akuten Nierenversagen zeigen konnten.

1.1.4. Mesenchymale Stammzellen

Stammzellen lassen sich anhand ihrer Herkunft vereinfacht in embryonale und adulte Stammzellen einteilen [116]. Wenige Tage nach der Befruchtung sind Stammzellen totipotent und können sich in einen kompletten, funktionsfähigen Organismus entwickeln [117]. Mit zunehmender Entwicklung des Embryos werden die embryonalen Stammzellen als pluripotent bezeichnet und können sich in zahlreiche verschiedene Zelltypen differenzieren, die den drei Keimblättern Ektoderm, Endoderm und Mesoderm angehören. Adulte Stammzellen lassen sich aus adultem Gewebe des Körpers isolieren und sind multi- oder unipotente Zellen [116]. Über den Nutzen pluripotenter Stammzellen als Quelle für differenzierte Zellen zur Reparatur von degeneriertem oder zerstörtem menschlichen Gewebe herrscht beträchtliche Kontroverse, vor allem aufgrund der Herkunft des verwendeten Materials. Aufgrund dessen und dem Vorteil, bei der Gewinnung der MSCs auf adultes Gewebe zurückgreifen zu können, wird die Fähigkeit der Umwandlung adulter, gewebespezifischer Stammzellen in andere Zelllinien intensiv beforscht [118]. Außer hämatopoetischen Stammzellen enthält das Knochenmark MSCs [119]. MSCs sind spindelförmige, plastikadhärente Zellen, die aus Feten, extra-embryonalen Geweben, adulten Organen inklusive Knochenmark und vielen anderen Geweben des Körpers isoliert werden können [116]. Nach den Kriterien der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie können MSCs durch drei Kriterien definiert werden. Erstens müssen MSCs plastikadhärent sein, wenn sie unter Standardkulturbedingungen in einer Zellkulturflasche kultiviert werden. Zweitens müssen bei flowzytometrischer Messung $\geq 95\%$ der MSC-Population CD105, CD73 und CD90 exprimieren. Gleichzeitig dürfen CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR nur in $\leq 2\%$ auf der Zelloberfläche von MSCs vorhanden sein. Drittens muss die Zelle die Fähigkeiten besitzen, sich unter Standarddifferenzierungsbedingungen in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren zu können [120].

Bereits Mitte der sechziger Jahre entdeckten Friedenstein et al. [121] MSCs, indem sie Knochenmarkfragmente und Knochenmarksuspension in zellundurchlässige Diffusionskammern applizierten, die anschließend Mäusen intraperitoneal transplantiert wurden. Nach Explantation zeigte sich die Entwicklung retikulären Gewebes und in manchen Fällen die Bildung von Knochen, während es nicht zur Hämatopoese kam. Obwohl nicht auszuschließen war, dass sich Knochen und retikuläres Gewebe aus separaten Stammzelllinien des Knochenmarks

entwickelten, gingen Friedenstein et al. von einer gemeinsamen Stammzelllinie aus. In Monolayer-Kulturen aus Knochenmark und Milz des Meerschweinchens konnte wenige Jahre später die Entwicklung einzelner Fibroblastenkolonien beobachtet werden, die in Gegenwart von Übergangsepithel, die Fähigkeit zur Osteogenese aufwiesen [122].

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich MSCs im Ruhezustand und sind überwiegend im Knochenmark lokalisiert. Sie umfassen geschätzt 0,001-0,01 % der gesamten Zellpopulation im Knochenmark [123]. Nach Stimulation, zum Beispiel durch ein Trauma, werden sie in peripheres mesenchymales Gewebe rekrutiert und funktionell aktiv [124].

Mehrere Studien haben gezeigt, dass MSCs neben ihrer ausgeprägten Proliferationsfähigkeit das Potential besitzen, sich in multiple Zelltypen, wie Tenozyten, Myozyten, Stromazellen, Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren und damit ihre Rolle als Stammzellen begründen [73, 123, 125]. Nach Bruder et al. [126] spielen MSCs nicht nur für das Wachstum embryonaler Knochen eine Rolle, sondern stellen darüber hinaus einen kontinuierlichen Vorrat osteogener Zellen dar, der für Umbauvorgänge und Frakturheilung des Knochens bis ins Erwachsenenalter notwendig ist.

Durch ihren potentiellen immunmodulatorischen Charakter werden MSCs als möglicher Therapieansatz für diverse Erkrankungen diskutiert, die neben rheumatischen Erkrankungen wie der RA [70, 127], dem SLE [114, 128], der AS [99, 129] weitere Erkrankungen umfassen, die mit Autoimmunität in Verbindung gebracht werden können. Diese reichen von neurologischen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer [130], der Autoimmunencephalomyelitis [131, 132] und der Multiplen Sklerose [133] bis hin zur Graft-versus-Host-Disease (GvHD) [134, 135], Diabetes mellitus [136], Asthma [137], Periodontitis [138], chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [139] und akutem Nierenversagen [115]. Darüber hinaus spielen MSCs sowohl in der regenerativen Medizin beim Tissue Engineering [140], als auch in der Therapie maligner Erkrankungen eine Rolle [141].

Die Tatsache, dass MSCs keine Alloantigene präsentieren und dass sie nicht auf eine MHC-Expression angewiesen sind, um ihre inhibitorischen Effekte auszuüben, bietet die Möglichkeit der Stammzellentnahme eines Spenders unabhängig von dessen MHC-Haplotyp und den therapeutischen Einsatz der MSCs als standardisiertes Reagenz für jeden Patienten. Der inhibitorische Effekt der MSCs auf die T-Zell-Antwort gegenüber Transplantationsantigenen kann somit genutzt werden um eine Host-versus-Graft-(HVG) und eine Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) zu kontrollieren [142]. Aggarwal und Pittenger [143] differenzierten Naive

T-Zellen in Richtung Th1-Effektorzellen und bestimmten die IFN γ -Produktion in Gegenwart und Abwesenheit von MSCs. In Kultur mit MSCs war die IFN γ -Produktion während der T-Zell-Differenzierung signifikant vermindert. Zusätzlich zur Inhibition der IFN γ -Produktion legen die Daten von Aggarwal und Pittenger nahe, dass MSCs die IL-4 Sekretion steigern können und damit eine Verschiebung von proinflammatorischen Th1-Zellen in Richtung antiinflammatorische Th2-Zellen bewirken, die das Management von GvHD positiv beeinflusst.

In Hinblick auf die Therapie von Diabetes mellitus konnte Boumaza et al. [136] unter Verwendung autologer MSCs aus dem Knochenmark von Ratten eine geförderte PDX-1- und Insulinexpression in den Langerhans-Inseln des Pankreas am Rattenmodell zeigen. Durch die Applikation von MSCs ließ sich neben einer Steigerung des Insulinspiegels im Serum, ein verändertes Zytokinmuster und ein erhöhter Anteil regulatorischer T-Zellen in der Peripherie beobachten.

Qu et al. [144] fanden heraus dass MSCs aus dem Knochenmark von Mäusen die Th17-Zelldifferenzierung durch IL-10 inhibieren können. Weiterhin könnte IL-10 die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t, durch Hochregulation der Expression von Suppressor of cytokine signaling (SOCS) Protein 3 über die Aktivierung von Signal transducers and activation of transcription (STAT) Protein 5, supprimieren. Der hemmende Einfluss von MSCs auf die Differenzierung humaner Naiver T-Zellen in Th17-Zellen wurde durch Ghannam et al. [145] festgestellt. Ferner war durch den Einfluss der MSCs eine inhibierte Produktion inflammatorischer Zytokine voll differenzierter Th17 Zellen zu erkennen.

MSCs unterdrücken über indirekte Mechanismen, die die Modulation Antigen-präsentierender dendritischer Zellen und die Förderung natürlicher oder induzierter FoxP3-exprimierender regulatorischer T-Zellen (Tregs) einschließen, eine destruktive, autoimmune Th1-Zell-Antwort [146].

In vitro Experimente konnten zeigen, dass MSCs aus dem Knochenmark von Pavianen die Proliferationsaktivität von Lymphozyten dosisabhängig hemmen können [147]. Eine signifikant verminderte Proliferationsaktivität von CD4⁺ und CD8⁺-T-Lymphozyten durch humane MSCs demonstrierten Di Nicola et al. [148] in Transwell®-Experimenten.

Nichtsdestotrotz verbleiben einige wesentliche Unstimmigkeiten und ein grundsätzlicher Mangel an Informationen bezüglich einer Reihe von Effekten, die MSCs auf T-Zell Subpopulationen ausüben [146]. Werden MSCs frühzeitig einer Kultur CD4⁺ T-Zellen unter Th17 polarisierenden Bedingungen hinzugefügt, wirken sie ausgeprägt immunsuppressiv auf Th1- und

Th17-Zellen. Nach bereits erfolgter Induktion der T-Zellpolarisierung supprimierten MSCs die Th1-Differenzierung, stimulierten jedoch die Th17-Differenzierung. Dieses Erkenntnis deutet darauf hin, dass therapeutisch eingesetzte MSCs in vivo je nach Zeitpunkt der MSC-Applikation und Aktivierungszustand der T-Zellen gegenteilige Auswirkungen auf die Krankheitsaktivität haben könnten [149]. Nach Zell-Zell-Kontakt mit MSCs, stellten Hsu et al. [150] eine erhöhte IL-17-Produktion bei $CD4^+CD45RO^+$ T-Gedächtniszellen fest. T-Zellen, die mit MSCs co-kultiviert wurden, wiesen im Gegensatz zu T-Zellen die alleine kultiviert wurden, 10-fach erhöhte Spiegel an IL-17 mRNA auf.

Naive unbehandelte MSCs können eine vorübergehende Erhöhung der $IFN\gamma$ und IL-2 Synthese durch aktivierte T-Zellen bewirken. Im Verlauf bewirken Zytokine von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) die Expression immunsuppressiver Moleküle wie Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) durch MSCs, die die T-Zell Proliferation blockieren [151].

Letztlich scheint die Immunantwort durch MSCs sowohl gefördert, als auch inhibiert zu werden und ist abhängig von der Dynamik der Inflammation, dem Aktivierungszustand des Immunsystems, den gegenwärtigen inflammatorischen Zytokinen und der Auswirkung von Immunsuppressoren [152].

2. Ziele der Arbeit

In der Vergangenheit haben bereits einige Arbeiten die Effekte von MSCs auf Zellen des Immunsystems beschrieben [73, 74, 145, 146, 149, 153-158]. Dabei wurde bisher nur vereinzelt darauf eingegangen, wie sich MSCs auf unterschiedliche T-Zellsubpopulationen auswirken können [159].

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von MSCs auf isolierte Naive $CD4^+$ T-Zellen und Nicht-Naive $CD4^+$ T-Zellen von gesunden Probanden und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen unter Th17-polarisierenden Bedingungen untersucht werden. Zunächst sollte geprüft werden, wie sich MSCs auf die Proliferation und die Apoptose Naiver und Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen auswirken. Von zentralem Interesse war weiterhin die Bestimmung des Phänotyps Naiver und Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen nach Interaktion mit MSCs, sowie die Bestimmung der Zytokinproduktion einzelner T-Zellsubpopulationen. Letztlich sollte die Auswirkung der MSCs auf die Chemokinrezeptorexpression Naiver und Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen analysiert werden.

Daraufhin wurden die Ziele der Arbeit in dargestellter Reihenfolge definiert:

- Etablierung eines Co-Kultur-Systems mit Naiven sowie Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen und MSCs.
- Polarisierung Naiver und Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen in Richtung Th17-Zellen, in Gegenwart und Abwesenheit von MSCs.
- Untersuchung der Beeinflussung von Proliferation und Apoptose isolierter Naiver und Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen durch MSCs.
- Bestimmung des Phänotyps, der Zytokinproduktion und der Chemokinrezeptorexpression Naiver und Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen nach Th17-Polarisation, in Kultur mit und ohne MSCs, für vier verschiedene, durch die Oberflächenantigene CD45RA und

CD27 definierte Subpopulationen: CD45RA⁺CD27⁻ TEMRA-, CD45RA⁺CD27⁺ Naive-, CD45RA⁻CD27⁺ Gedächtnis- und CD45RA⁻CD27⁻ Effektor-Zellen.

3. Material und Methoden

In diesem Abschnitt der Arbeit werden die verwendeten Materialien und Geräte einschließlich Beschreibung, Firma, Katalog- und Produktnummer zunächst tabellarisch aufgelistet. Im Anschluss erfolgt die detaillierte Erläuterung der experimentellen Methoden und statistischen Tests.

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 1 zeigt die verwendeten Zytokine zur Polarisierung Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th17 Zellen. Stimulantien zur Aktivierung und klonalen Expansion der isolierten T-Zellen sind in Tabelle 2 dargestellt. Kits zur T-Zellisolierung gibt Tabelle 3 wieder. Ausgewählte Antikörper der extra- und intrazellulären Immunfluoreszenzfärbung können Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 1: Zytokine Th-17 Polarisation

<i>Zytokin</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr./Produkt-Nr.</i>
IL-6	Interleukin-6	Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland	11340064
IL-1 β	Interleukin-1	Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland	11340013
IL-23	Interleukin-23	Biolegend, San Diego, USA	574102
TGF- β	Transforming Growth Factor β	Biolegend, San Diego, USA	580702

Tabelle 2: T-Zell Stimulantien

<i>Stimulanz</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr./Produkt-Nr.</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P8139-1MG
Ionomycin	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I9657-1MG
Brefeldin A	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B6542-5MG
Anti-CD3-Antikörper	LEAF™ Purified anti-human CD3 Antibody	Biolegend, San Diego, USA	317315
Anti-CD28-Antikörper	LEAF™ Purified anti-human CD28 Antibody	Biolegend, San Diego, USA	302923

Tabelle 3: Kits zur T-Zellisolierung

<i>Kit</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr./Produkt-Nr.</i>
Isolierungs-Kit CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130096533
Isolierungs-Kit Naive CD4 ⁺ T-Zellen	Naive CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130094131

Tabelle 4: Antikörper extra- und intrazelluläre Färbung

<i>Antikörper</i>	<i>gekoppelt mit</i>	<i>Firma</i>	<i>Klon</i>	<i>Chargen-Nr.</i>	<i>Katalog-Nr.</i>
Annexin V	FITC	BioLegend, San Diego, USA	-	B149371	640906
7AAD	APC	BioLegend, San Diego, USA	-	B149025	420404
CCR5 (CD195)	APC Cy7	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	2D7/CCR5	03784	557755
CCR6 (CD196)	PerCP Cy5.5	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	11A9	02597	560467

Material und Methoden

CD27	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA	LG.3A10	B153824	124216
CD127	BV421	BioLegend, San Diego, USA	A019D5	B154560	351310
CD161	APC	BioLegend, San Diego, USA	HP-3G10	B156046	339912
CD25	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	M-A251	18891	555431
CD45RA	BV421	BioLegend, San Diego, USA	HI100	B140325	304130
CD62L	PE	BioLegend, San Diego, USA	DREG-56	B133139	304806
CXCR3 (CD183)	PerCP Cy5.5	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	1C6/CXCR3	17611	560832
FoxP3	PerCP Cy5.5	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	236a	23588	561493
IFN γ	FITC	BioLegend, San Diego, USA	4S.B3	B133524	502506
IL-10	APC	BioLegend, San Diego, USA	JES3-19F1	B143010	506807
IL-13	PE	BioLegend, San Diego, USA	JES10-5A2	B121975	501903
IL-17A	Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, USA	BL168	B132984	512318
IL-9	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	MH9A3	64922	560807
Ki67	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	B56	88789	51-36524X

3.1.2. Pufferlösungen, Zellkultur-, Nähr- und Trennmedien

Genutzte Pufferlösungen und Trennmedien werden in Tabelle 5, gebrauchsfertige Pufferlösungen, Nähr- und Trennmedien in Tabelle 6 zusammengefasst. Die verwendeten Zellkulturmedien für MSCs und T-Zellen werden in Tabelle 7 und Tabelle 8 beschrieben.

Tabelle 5: Pufferlösungen und Trennmedien

<i>Pufferlösung/ Trennmedium</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr./Produkt-Nr.</i>
Permeabilization Wash Buffer 10x	Cytoperm	Biolegend, San Diego, USA	421002
Fixation Buffer	Cytofix	Biolegend, San Diego, USA	420801
PBS	Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5493
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D8418-50ML
Ficoll	FicoLite-H (Human)	LINARIS blue, Wertheim-Bettingen, Deutschland	GTF1511KYA
BSA	Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A2058-1G
Trypsin/EDTA	Trypsin-EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	L11-004
RLT-Buffer	RNeasy Lysis Buffer	Qiagen, Venlo, Niederlande	79216
2-Mercapto-ethanol	-	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland	4227.1
Annexin V Binding Buffer	-	Biolegend, San Diego, USA	422201

Material und Methoden

Tabelle 6: Gebrauchsfertige Pufferlösungen, Nähr- und Trennmedien

<i>Pufferlösung, Nähr-u. Trennmedium</i>	<i>Beschreibung</i>
FACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA, 0,01% Natriumazid (2%)
MACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA, pH 7,2
Erythrozyten-Lysis-Buffer	8,26g NH ₄ Cl, 1g KHCO ₃ , 0,037g EDTA, gelöst in 1l Aqua destillata, pH 7,3
Nährmedium T-Zellen	RPMI, 1% PenStrep, 10% FCS
Nährmedium MSC	DMEM/Ham's F12, 50ml FCS (= Endkonz. von 10%), 5ml (100x) Pen/Strep, 500µl L-Ascorbic acid 2-phosphate (Endkonz. 50µg/ml)
Einfriermedium	RPMI, 20% FCS, 10% DMSO

Tabelle 7: Zellkulturmedium MSCs

<i>Beschreibung</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr./Produkt-Nr.</i>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F12 Ham	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D9785
1% Penicillin-Streptomycin (100x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	A2213
0,1% L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt (Endkonz. 50µg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A8960
10% FCS (Fetales Kälber Serum)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA	10270-106

Tabelle 8: Zellkulturmedium T-Zellen

<i>Beschreibung</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr./Produkt-Nr.</i>
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R8758
1% Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	A2213
10% FCS (Fetales Kälber Serum)	GIBCO Life Technologies, Carlsbad, USA	10270-106

3.1.3. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Eingesetzte technische Geräte und Instrumentarium veranschaulicht Tabelle 9. Software zur Analyse flowzytometrischer Daten und statistischer Auswertung ist in Tabelle 10 gezeigt. Letztlich wird in Tabelle 11 unterschiedliches Verbrauchsmaterial aufgelistet.

Tabelle 9: Instrumentarium und Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog-Nr./Produkt-Nr.</i>
Flowzytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	338962
Inkubator	B 5060 EK-CO2	Heraeus, Hanau, Deutschland	50001834
Kühlschränke	TP 1410 Comfort	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland	TP 1410-21
	Hera Freeze -86°C	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	51019576
Mikroskop	Wilovert S 30 Inverses Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland	1010335
Zählkammer	Neubauer- Zählkammer	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland	ZK03
Laminar Flow Hood	Gelaire BSB 6A	Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland	11031

Material und Methoden

Zentrifugen	Rotixa/P	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland	4201
	Rotanta/K	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland	3512
	Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland	1610
Vortexer	Retsch Mixer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland	-
MACS System	VarioMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-090-282
	QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-090-976
Pipetten	Pipetboy pro	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland	156 401
	Eppendorf Research® plus 0,1-2,5µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3120000011
	Eppendorf Research® plus 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3120000020
	Eppendorf Research® plus 2-20µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3120000038
	Eppendorf Research® plus 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3120000046
	Eppendorf Research® plus 20-200µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3120000054
	Eppendorf Research® plus 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	3120000062

Tabelle 10: Software

Flowzytometrie	BD FACSDiva Software Version 6.1.3, Firmware Version 1.47 (BD FACSCanto II), BD Biosciences, Franklin Lakes, New York, USA
Statistik	IBM SPSS Statistics Version 22, Armonk, New York, USA

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchs- material	Beschreibung	Firma	Katalog-Nr./Produkt-Nr.
Pipettenspitzen	Pipettenspitze 20µl	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland	70.1116
	Pipettenspitze 200µl	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland	70.760.002
	Pipettenspitze 1000µl	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland	70.762
Falcon Tubes	Cellstar, 15ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	188271
	Cellstar, 50ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	227261
Cryo Tubes	Cryo.s™, PP	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	122278
Freezing Con- tainer	Nalgene Mr Frosty Freezing Container	Nalgene, Rochester, USA	51000001
Zellkultur- einsätze	ThinCert™ 24 Well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	12100116
Filter Tubes	Cell-Strainer 5ml Round Bottom Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	352235
Glaspipetten	Cellstar, 10ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	607180
Eppendorf AG Tubes	SafeSeal Rea- giergefäß 1,5ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland	72.706.200
	SafeSeal Rea- giergefäß 2ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland	72.695.500
Schraubbröhr- chen	Mikro- Schraubröhre 1,5ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland	72.692.005

Material und Methoden

Zellkulturfla- schen	CELLSTAR® Standard	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	660160
Zellkultur- platten	24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	662160
	48 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	677180
	96 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land	655180
Zellscraper	Cell Scraper 25cm	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland	5013400
FACS Tube	Falcon® 5ml Round Bottom Tube	Corning, Inc., New York, USA	352008

3.2 Methoden

3.2.1. Ethische Voraussetzungen

Zu Beginn der Arbeit wurde der Antrag auf Begutachtung und Zulassung des medizinischen Forschungsprojektes durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg unter dem Aktenzeichen 123/14 gestellt. Nach Genehmigung des Ethikvotums begann die Gewinnung des Probenmaterials, welche sich über einen Zeitraum von Oktober 2012 bis Oktober 2013 erstreckte.

Gesunde Kontrollprobanden und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wurden sowohl in mündlicher als auch in schriftlicher Form über den Inhalt des Forschungsprojekts aufgeklärt. Nach einem ausführlichen ärztlichen Gespräch erhielten Patienten und Kontrollpersonen zusätzlich ein Informationsblatt über den Inhalt der Studie und unterzeichneten die Einverständniserklärung. Sämtliche Untersuchungen und Arbeiten dieses Projektes wurden unter Beachtung der Deklaration von Helsinki 2011 sowie nach den Prinzipien der Good Clinical Practice und der Good Laboratory Practice durchgeführt.

3.2.2. Patienten

Bei dem vorgestellten Projekt handelt es sich um eine explorative Datenanalyse mit Hypothesen-generierendem Ansatz, weshalb die experimentellen Untersuchungen anhand von vier Proben durchgeführt wurden. Die vier exemplarisch ausgewählten Probanden mit einer autoimmun bedingten Arthritis im Rahmen einer rheumatischen Erkrankung wurden im Zuge der Vorstellung in der Rheumatologischen/Immunologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg rekrutiert. Die Blutentnahme für die Studie erfolgte im Zuge der Routineblutentnahme. Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität erfolgte abhängig vom jeweiligen Krankheitsbild die Bestimmung des Disease Activity Score 28 (DAS28), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) und Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI). Zusätzlich wurde für jeden Patienten Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) nach einer Stunde (1h), C-reaktives Protein (CRP) in mg/dl, Leukozyten in $n \cdot 1000/\mu\text{l}$ und die Medikation zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmt. Jeder Patient wurde anamnestisch befragt und klinisch-internistisch inklusive komplettem Gelenkstatus untersucht. Unter den vier Patienten erfüllten zwei von Ihnen die 2010 ACR / EULAR Kriterien zur Klassifikation der RA [53]. Nach den Diagnosekriterien der ESSG (European Spondylarthropathy Study Group) wies ein untersuchter Patient eine SA auf [91]. Bei einem weiteren Probanden konnte nach den Diagnosekriterien des American College of Rheumatology (ACR) die Diagnose SLE gestellt werden [109, 110].

Tabelle 12 gibt die Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wieder. Die Patientengruppe wird im Ergebnisteil ausführlich charakterisiert.

Tabelle 12: Ein- und Ausschlusskriterien Patienten

Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Malignome- Kongenitale Fehlbildungen- Syndrome (z.B. Trisomie 21, Turner-Syndrom, Fragiles-X-Syndrom)- Immundefekte- Klinisch relevante Infektionen in den letzten acht Wochen- Impfungen in den letzten vier Wochen
Einschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Autoimmunbedingte entzündlich-rheumatische Erkrankungen- Erwachsene Patienten im Alter zwischen 19 und 80 Jahren- Weibliches und männliches Geschlecht

3.2.3. Gesunde Probanden

Vollblutproben für die gesunde Kontrollgruppe konnten von immunologisch gesunden Patienten der Klinik & Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Würzburg gewonnen werden. Aufgrund des Einflusses des Alters auf die T-Zell Differenzierung wurde auf eine möglichst altersgleiche Verteilung von Kontroll- und Patienten Wert gelegt. Die Ein- und Ausschlusskriterien der gesunden Kontrollgruppe werden in Tabelle 13 wiedergegeben. Die ausführliche Beschreibung der gesunden Kontrollgruppe kann dem Ergebnisteil entnommen werden.

Tabelle 13: Ein- und Ausschlusskriterien gesunde Probanden

Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Malignome- Kongenitale Fehlbildungen- Syndrome (z.B. Trisomie 21, Turner-Syndrom, Fragiles-X-Syndrom)- Immundefekte- Klinisch relevante Infektionen in den letzten acht Wochen- Impfungen in den letzten vier Wochen- Autoimmunbedingte entzündlich-rheumatische Erkrankungen
Einschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Erwachsene, immunologisch gesunde altersgleiche Patienten- Weibliches und männliches Geschlecht

3.2.4. MSC-Spender

Durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. N. Schütze, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg, war es möglich, MSCs in extrahierter, gereinigter und bereits kultivierter Form zu erhalten. Die Entnahme der MSCs erfolgte durch Ärzte der Orthopädischen Klinik des König-Ludwig-Hauses Würzburg während eines operativen Eingriffes zum Hüftgelenkersatz durch eine Hüft-Totalendoprothese (Hüft-TEP). Spongiöses Knochenmaterial zur Isolierung der MSCs, wurde aus dem Bereich des Acetabulums gewonnen.

Die weitere Verarbeitung des Knochenmaterials erfolgte nach einem standardisierten Protokoll [160]. Nach Entnahme des spongiösen Knochens, wurde dieser zunächst in DMEM/Ham's F12 Medium, Mischungsverhältnis 1:1 (Firma Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) transferiert und gewaschen. Nach Zentrifugation bei 270g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und der spongiöse Knochen mehrmals mit DMEM/Ham's F12 Medium, Mischungsverhältnis 1:1 gewaschen. Die Überstände jedes einzelnen Waschschruttes wurden gesammelt und die Zellen durch Zentrifugation bei 270g für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einem Nährmedium aus DMEM/Ham's F12 Medium, Mischungsverhältnis 1:1, 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (Firma Biochrom, Berlin, Deutschland), 100U/ml Penicillin (Firma Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), 100 µg/ml Streptomycin (Firma Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 50µg/ml L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Firma Sigma-

Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) rekonstituiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^7 Zellen pro 175cm^2 und einem Gesamtvolumen von 25ml in Zellkulturflaschen ausgesät und für 48h-72h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, gefolgt von einem Waschschritt mit PBS. Die adhärenenten Zellen wurden für 10 bis 14 Tage in Nährmedium expandiert bis Konfluenz erreicht war. Die MSCs wurden anschließend gekühlt (4°C) in Zellkulturflaschen in das Labor für Pädiatrische Rheumatologie/Spezielle Immunologie der Universitäts-Kinderklinik der Universität Würzburg transportiert und wie unter Kapitel 3.2.5.3. Auftau- und Einfrierverfahren beschrieben, zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Für die durchgeführten Experimente waren MSCs von zwei Spendern nötig, die im Ergebnisteil unter Kapitel 4.2.3. MSC-Spender charakterisiert werden. Die MSCs beider Spender befanden sich zu Beginn der Experimente in Passage 1. Die Ein- und Ausschlusskriterien der MSC-Spender können Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 14: Ein- und Ausschlusskriterien MSC-Spender

Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Malignome- Hüftkopfnekrose- Hüftkopftrauma- Kongenitale Fehlbildungen- Syndrome (z.B. Trisomie 21, Turner-Syndrom, Fragiles-X-Syndrom)- Immundefekte- Klinisch relevante Infektionen in den letzten acht Wochen- Autoimmunbedingte entzündlich-rheumatische Erkrankungen
Einschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">- Erwachsene, immunologisch gesunde Probanden männlichen und weiblichen Geschlechts

3.2.5. Zellkultur und Polarisation

3.2.5.1. Ficoll Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMC

Zur Isolierung von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) aus Vollblut wurde die Methode nach Böyum (1968) angewendet [161]. Diese funktioniert nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation und separiert PBMCs aufgrund ihrer spezifischen Dichte von Erythrozyten und Granulozyten. Als Trennmedium diente das Flotationsmittel Ficoll (Saccha-

rose-Epichlorhydrin-Copolymer) [161]. Dazu wurde in ein 50ml Falcon Tube 10ml Ficoll vorgelegt und anschließend vorsichtig mit 20ml Vollblut aus einer Einmalpipette so überschichtet, dass sich ein Verhältnis von 1/3 Ficoll zu 2/3 Blut ergab (siehe Abbildung 2). Im Anschluss daran erfolgte die Zentrifugation von Vollblut und Ficoll bei 510g über einen Zeitraum von 25 Minuten. Abbildung 2 veranschaulicht den Zustand nach Zentrifugation der Vollblutprobe schematisch. Die PBMCs konnten nun mit einer 10ml Glaspipette vorsichtig extrahiert und in ein 50ml Falcon Tube überführt werden. Nach Zugabe von 0,9% NaCl Lösung und Zentrifugation für 10 Minuten bei 510g ließen sich toxische Ficoll-Rückstände aus den extrahierten PBMCs entfernen. Es erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit 5ml Erythrozyten-Lysis-Puffer und die anschließende Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Durch den Erythrozyten-Lysis-Puffer ließen sich vorhandene Erythrozyten eliminieren und eine Verunreinigung der Zellsuspension vermeiden. Die Zellen wurden nach Ablauf der Zeit in 10ml Nährmedium (RPMI 10% FCS) überführt und erneut für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Bevor mit der Zellzählung im folgenden Schritt begonnen werden konnte, schloss sich die erneute Resuspension des Zellpellets in 5ml Nährmedium an.

3.2.5.2. Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Zur Zählung der isolierten PBMCs genügte die Entnahme von 10µl der Zellsuspension, die zusammen mit 90µl Trypanblau in ein Eppendorf AG Tube pipettiert und anschließend gründlich gemischt wurde (Vortex). Es folgte die Pipettierung von 10µl der Suspension in die Neubauer-Zählkammer und die sich daran anschließende lichtmikroskopische Zählung sowie Beurteilung der Zellen. Trypanblau kann intakte Plasmamembranen der PBMCs nicht passieren, so dass dieses Färbeverfahren auch eine Aussage über die Vitalität der Zellen zulässt. Während lebendige Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen können, lagert sich dieser in destruierten oder toten Zellen an. Nach Auszählung zweier Großquadrate in der Neubauer Zählkammer konnte die Zellzahl nach folgender Formel berechnet werden:

$\text{Gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen (ml)} = \text{Totale Zellzahl der Probe}$
--

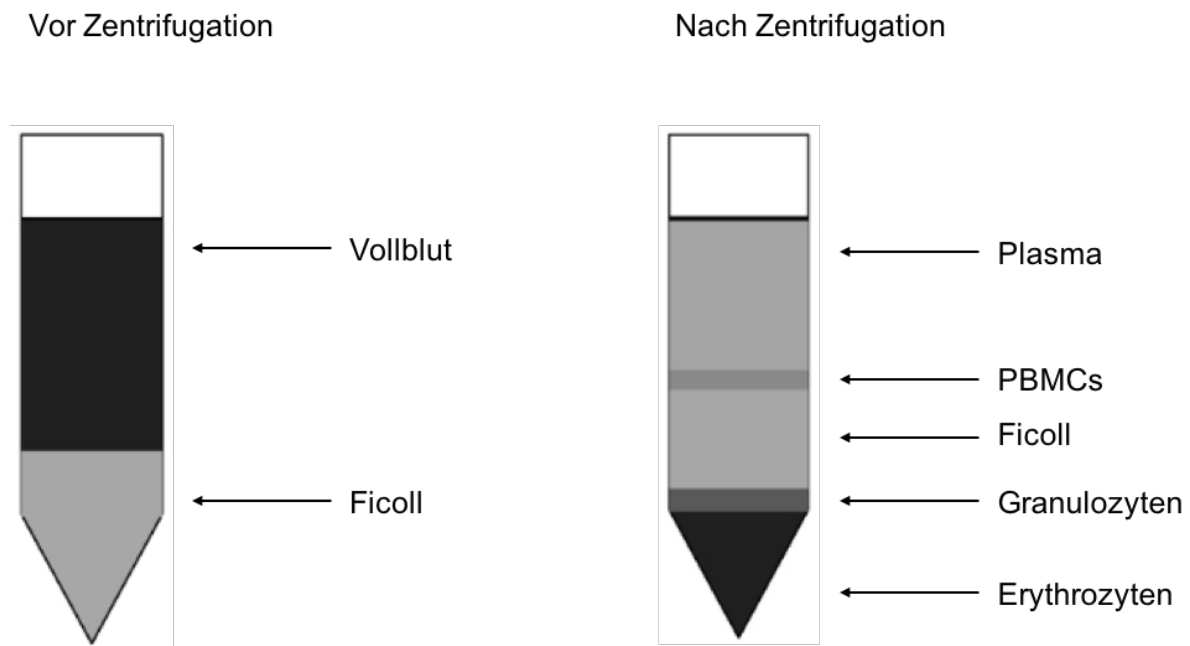


Abbildung 2

Vollblutprobe und Ficoll *vor* und *nach* Zentrifugation mit typischer Schichtung (modifiziert nach [162])

3.2.5.3. Auftau- und Einfrierverfahren

Um flexibel arbeiten zu können, stellten das Auftauen und Einfrieren verschiedener Zellpopulationen wichtige Standardverfahren dar. Für die Kryokonservierung von Zellen wurde Einfriermedium verwendet, welches 70% RPMI, 20% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) beinhaltet. DMSO ist ein organisches Lösungsmittel und weist zytotoxische Effekte auf. Sowohl vor dem Einfrieren als auch nach dem Auftauen der PBMCs kann es zu Zellschäden kommen [163]. Um zellschonend zu arbeiten, wurde darauf geachtet, dass die Zellen nur möglichst kurz dem flüssigen Einfriermedium ausgesetzt waren. Zellen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden sollten, wurden in Kryotubes zu je 5×10^6 Zellen in 1ml Einfriermedium eingefroren. Die weitere Konservierung der Zellen erfolgte in einer Frosty-Box bei -80°C für 3 Tage und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -197°C . Beim Auftauverfahren wurde eine definierte Zellzahl dem Stickstofftank entnommen und in einer Frosty-Box bei -80°C unverzüglich zum Laborarbeitsplatz transportiert. Der weitere Auftauprozess gliederte sich standardisiert in der Erwärmung der Zellen im Wasserbad bei 37°C und der Überführung in 10ml angewärmtes Nährmedium. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 400g und anschließender Resuspension mit Nährmedium, konnten die aufgetauten Zellen von toxischem Einfriermedium isoliert werden. Die weitere Konservierung der Zellen bei 4°C - 8°C im Kühlschrank ermöglichte die problemlose Weiterverarbeitung der PBMCs am darauffolgen-

den Tag. Das Einfrier- bzw. Auftauverfahren für MSCs erfolgte analog. Unterschiede bestanden lediglich bei der Zentrifugation (MSCs: 260g statt 400g) und dem verwendeten Zellkulturmedium (siehe Kapitel 3.1.2. Pufferlösungen, Zellkultur-, Nähr- und Trennmedien).

3.2.5.4. Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Für die spätere Etablierung einer Co-Kultur mussten MSCs zunächst aufgetaut, in Zellkulturflaschen überführt und darin vermehrt werden. Zur Überführung von aufgetauten MSCs in die Zellkulturflaschen dienten 10ml auf 37°C° angewärmtes Stammzellmedium. Nach vorsichtiger, tropfenweiser Einbringung der Zellen in das Medium ließ sich vorhandenes Einfriermedium bei 260g und fünfminütigem Zentrifugieren entfernen. Nach Absaugen des Überstandes konnten die Zellen in 10ml Nährmedium aufgenommen und je nach Zellzahl in geeignete Zellkulturflaschen der Größen 25cm², 75cm² und 150cm² ausgesät werden. Während der Inkubationszeit befanden sich die MSCs bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Verbrauchtes Zellmedium wurde nach 3 Tagen Inkubationszeit unter sterilen Bedingungen in einem Laminar Flow Hood mittels einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch neues auf 37°C° angewärmtes Medium ersetzt. Das Splitten von Zellen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll und unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung zum Ablösen der adhärenen Zellen. Nach fünfminütiger Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C° unter Einwirkung von Trypsin/EDTA ließen sich die Stammzellen unter Zuhilfenahme eines Zellscrapers vom Boden der Zellkulturflasche ablösen und für darauffolgende Waschschriffe und Zellzählungen in ein 50ml Falcon Tube überführen.

3.2.5.5. Magnetic Activated Cell Sorting (MACS®)

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS®) bezeichnet ein schonendes Verfahren zur Separation von Lymphozyten- und anderen Zellpopulationen. Das Funktionsprinzip beruht auf Antikörpern, die an spezifischen Antigenen auf der Zelloberfläche binden und ihrerseits von Antikörpern gebunden werden können, die mit 50nm kleinen Magnetkügelchen, sogenannten MicroBeads, markiert sind. Lässt man verschiedene Zellpopulationen in einer Säule durch ein Magnetfeld laufen, so werden die Zellen in der Säule zurückgehalten, die den mit MicroBeads markierten Antikörper indirekt binden (siehe Abbildung 3).

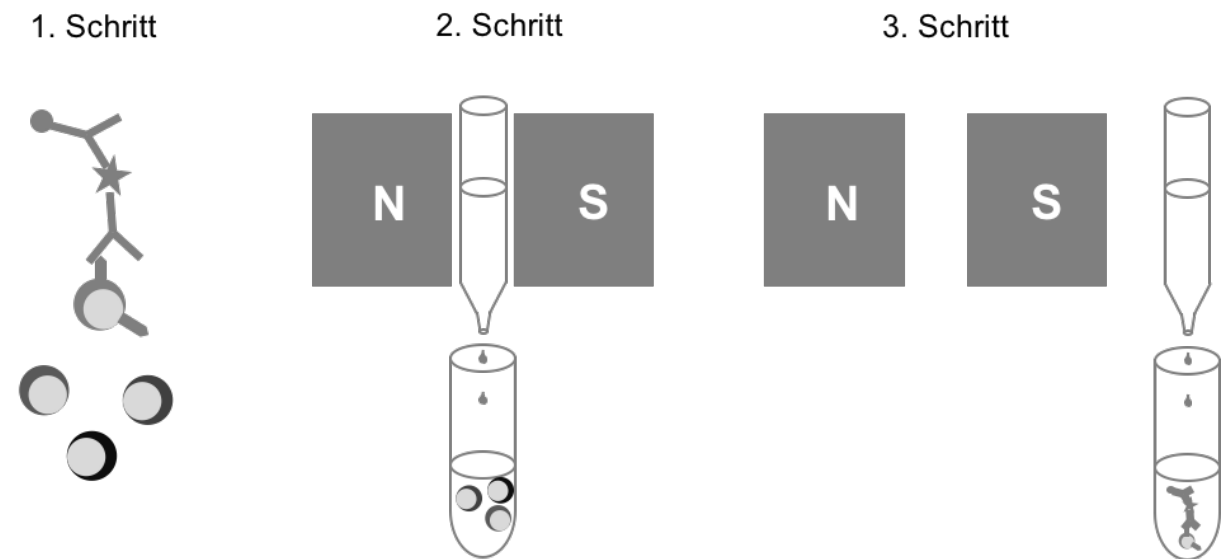


Abbildung 3

Funktionsprinzip der Magnetic Activated Cell Separation (MACS®) (modifiziert nach[164])

1. *Schritt:* Die mit einem MicroBead markierten Antikörper binden indirekt an die Zelloberfläche.
2. *Schritt:* Die Antikörperbindende Zelle verbleibt durch das Magnetfeld in der Säule.
3. *Schritt:* Nach der Entfernung des Magneten können die Antikörpermarkierten Zellen extrahiert werden.

Zellen welche keinen Antikörper binden laufen ungehindert durch die Säule und werden als negative Fraktion bezeichnet. Antikörper-markierte Zellen verbleiben in der Säule und werden als positive Fraktion bezeichnet. Sie können nach Entfernen des Magneten separat in einem 15ml Falcon Tube aufgefangen werden. Für die Co-Kultur mit MSCs sollten Naive $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+$ Nicht-Naive T-Zellen aus PBMCs isoliert werden. Um eine möglichst große Zellausbeute zu erhalten, wurde im ersten Schritt der Zellisolierung ein $CD4^+$ T-Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotech verwendet (siehe Kapitel 3.1.1. Reagenzien Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung). Damit war es möglich $CD4^+$ T-Zellen von Nicht- $CD4^+$ T-Zellen wie beispielsweise Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, B-Zellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Granulozyten, γ/δ T-Zellen oder erythroiden Zellen, durch Depletion zu isolieren [165]. Zur Gewinnung von Naiven $CD4^+$ T-Zellen wurde die negative Fraktion ($CD4^+$ T-Zellen) aus dem ersten Isolationsverfahren im zweiten Schritt einer weiteren Zelldepletion unter Verwendung eines Naiven $CD4^+$ Isolations Kits (siehe Kapitel 3.1.1. Reagenzien Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung) unterzogen. $CD45RO^+$ ($CD45RA^-$) Gedächtnis Zellen und Nicht- $CD4^+$ T-Zellen wurden durch dieses Kit indirekt magnetisch markiert [166]. Im Eluat der negativen Fraktion erhielten wir Naive $CD4^+$ T-Zellen mit einer Reinheit über 90%. Die retinierten Zellen in der Säule bildeten die positive Fraktion und wurden als Nicht-Naive T-Zellen bezeichnet (siehe Abbildung 4). Eine definierte Menge Nicht- $CD4^+$ Zellen wurde für die Ge-

winnung von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) konserviert (siehe Kapitel 3.2.5.6. Co-Kultur MSC und T-Zellen).

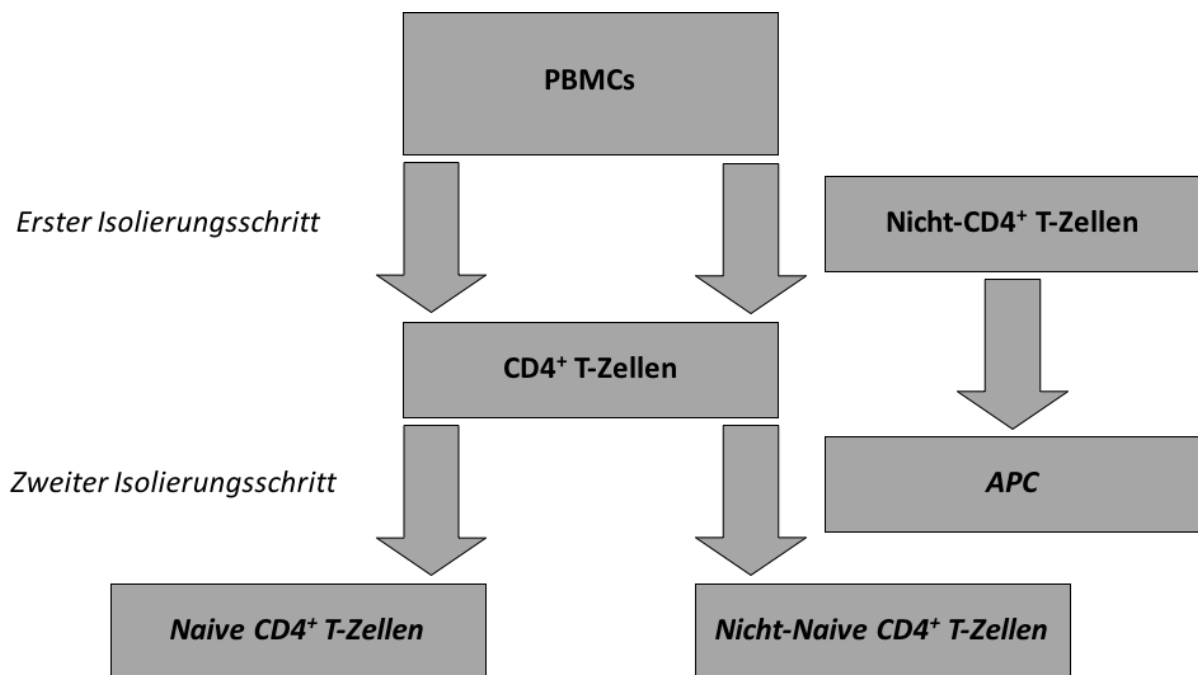


Abbildung 4

Schema der einzelnen Isolierungsschritte zur Gewinnung Naiver- und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen und APCs (Antigenpräsentierende Zellen).

Es folgt eine detaillierte Beschreibung der beiden Isolationsschritte.

Die am Vortag aufgetauten und im Kühlschrank inkubierten PBMCs wurden vor der Isolation erneut gezählt, anschließend bei 400g für 10 Minuten zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 40µL MACS-Puffer pro 10⁷ PBMCs resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 10µL des CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail pro 10⁷ Zellen und nach gründlichem Vortexen die Inkubation im Kühlschrank (2-8°C) für 5 Minuten. Nun wurden 30µL MACS-Puffer und 20µL CD4⁺ T Cell MicroBead Cocktail pro 10⁷ Zellen hinzugefügt. Nach erneutem Vortexen war eine weitere zehnminütige Inkubationszeit im Kühlschrank (2-8°C) nötig. Für die anschließende eigentliche Separation wählten wir den MACS Separator VarioMACS™ und eine MACS Säule der Größe LS. Die Isolierung begann mit der Vorbereitung der Säule durch Spülung dieser mit 3ml MACS-Puffer. Jetzt konnte die Zellsuspension auf die gespülte Säule appliziert und die CD4⁺ T-Zellen in einem 15ml Falcon Tube aufgefangen werden. Eine erneute Spülung der Säule mit 3ml MACS-Puffer schloss sich an, um restliche CD4⁺ T-Zellen aufzufangen. Nachdem die Zellsuspension vollständig durch die Säule geflossen war konnte diese aus dem Magneten des MACS-Separators entfernt werden. Um die Nicht-CD4⁺ Zellen gewinnen

zu können wurden 5ml MACS-Puffer auf die Säule appliziert und die in der Säule retinierten Zellen mit einem Stempel zügig und mit geringem Druck aus der Säule gespült [165].

Nach Zellzahlbestimmung der $CD4^+$ T-Zellen, schloss sich der zweite Isolierungsschritt zur Gewinnung der Naiven $CD4^+$ T-Zellen und der Nicht-Naive T-Zellen an. Die Einzelschritte des zweiten Isolierungsschrittes erfolgten analog zum ersten Isolierungsschritt. Jedoch wurde jetzt anstelle des $CD4^+$ T Cell Biotin-Antibody Cocktail der Naive $CD4^+$ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II und anstelle des $CD4^+$ T Cell MicroBead Cocktail der Naive $CD4^+$ T Cell MicroBead Cocktail II verwendet. Nach Überführung der Zellen in vorbereitetes Nährmedium erfolgte die Zellzählung der Naiven $CD4^+$ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen sowie die Inkubation im Kühlschrank bei 2-8°C [166]. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an Zelloberflächen zu reduzieren wurden sämtliche Arbeitsschritte der Zellisolation auf Eis und unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow Hood durchgeführt.

Vor Etablierung einer Co-Kultur mit MSCs wurden die isolierten Zellen einer Reinheitskontrolle durch Flowzytometrie unterzogen. Für die Bestimmung der Reinheit war die Entnahme von zweimal 30µL Zellsuspension der positiven Fraktion (Nicht-Naive T-Zellen) und einmal 30µL Zellsuspension der negativen Fraktion (Naive $CD4^+$ T-Zellen) nötig. Durch die zweimalige Entnahme von 30µL der positiven Fraktion konnte auch eine ungefärbte Kontrolle der Zellen mitgemessen werden. Tabelle 15 veranschaulicht das Färbepanel für die Reinheitsbestimmung. Das Volumen der verwendeten Antikörper betrug sowohl für die Oberflächenfärbung als auch für die intrazelluläre Färbung 0,5µL. Die einzelnen Arbeitsschritte der Oberflächen- und Intrazellulären Färbung werden im Kapitel 3.2.6. Flowzytometrie ausführlich erläutert. Nach Resuspension in 200µL FACS-Puffer wurde die Reinheit unverzüglich im Flowzytometer gemessen und anschließend mit der Software FACSDiva graphisch ausgewertet. Abbildung 5 zeigt im rechten oberen Quadranten des Diagramms den prozentualen Anteil Naiver $CD4^+$ T-Zellen (90,7%). Es wurden nur Zellen mit einer Reinheit von $\geq 90\%$ verwendet.

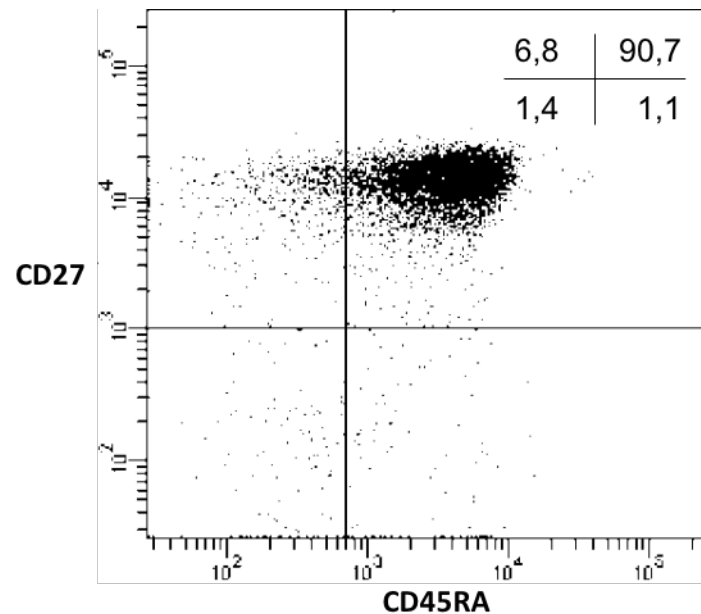


Abbildung 5

Flowzytometrische Bestimmung der Reinheit CD45RA⁺CD27⁺ Naiver CD4⁺ T-Zellen. Die Zahlenwerte im rechten oberen Quadranten geben die prozentuale Anteile der vier Phänotypen TEMRA-(CD45RA⁺CD27⁻), Naive-(CD45RA⁺CD27⁺), Gedächtnis-(CD45RA⁻CD27⁺) und Effektor-(CD45RA⁻CD27⁻) Zellen wieder. Die Reinheit der Naiven-Zellen betrug in diesem exemplarischen Fall 90.7%.

Tabelle 15: Färbepanel zur Bestimmung der Reinheit Naiver CD4⁺ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen.

Antikörper	Gekoppelt mit
CD27	PE-Cy7
CD45RA	BV421

3.2.5.6. Co-Kultur MSC und T-Zellen

Zur Etablierung einer Co-Kultur mit MSCs und verschiedenen T-Zell Subpopulationen mussten die adhärennten Stammzellen zunächst vom Boden der Zellkulturflächen gelöst und anschließend in die Wells eingebracht werden. Dazu wurde Stammzellmedium und PBS auf 37°C und Trypsin/EDTA (1x) -Lösung auf Raumtemperatur vorgewärmt. Das Absaugen von verbrauchtem Medium erfolgte durch sterile Pasteurpipetten. Anschließend wurden die Zellen mit einer entsprechenden Menge PBS gewaschen um tote, nicht adhärenente Zellen sowie

Zelldebris zu entfernen. Mit dem Einbringen von Trypsin/EDTA (1x) - Lösung in die Zellkulturflasche begann die Abrundung und schließlich die Ablösung der Stammzellen vom Flaschenboden. Die Zellen wurden während dieser Phase bei 37°C für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und mehrmals unter dem Mikroskop kontrolliert. Durch vorsichtiges Rütteln der Zellkulturflasche und unter Zuhilfenahme eines Zellscrapers ließ sich die Zellausbeute deutlich steigern. Das Abstoppen der Trypsinisierung gelang durch Einbringung von FCS-haltigem Kulturmedium. Die Zellen wurden nach fünfminütiger Zentrifugation bei 260g aus der Zellkulturflasche entnommen, in ein 50ml Falcon Tube pipettiert und vor der Zellzählung in einem definierten Volumen Kulturmedium aufgenommen. Die MSCs konnten jetzt auf die vorgesehenen Wells im Verhältnis $0,25 \times 10^5$ /Well aufgeteilt und in jeweils 500µl Nährmedium über Nacht im Brutschrank inkubiert werden. Um die Proliferationsrate zu steigern wurden antigenpräsentierende Zellen (APCs) in den Wells verwendet. Dazu wurden 5×10^6 Nicht-CD4⁺ T-Zellen in der Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Würzburg durch den Linearbeschleuniger Primus M der Firma Siemens, Erlangen, Deutschland mit Photonen bestrahlt. Die Photonenenergie betrug 6 Megavolt (MV), die Feldgröße der Bestrahlung 40x40cm². Insgesamt wurde über einen Zeitraum von ungefähr 3 Minuten eine Energiedosis von exakt 30 Gray (Gy) auf die Zellen appliziert. Die Bestrahlung unterbindet Stoffwechselfunktionen und Proliferation der APCs, während die antigenpräsentierende Funktion der Zellen erhalten bleibt.

Abbildung 6 zeigt die Konfiguration der angelegten Wells, die sowohl Naive CD4⁺ T-Zellen und Effektor Zellen gesunder Probanden, als auch von Patienten enthalten. T-Zellen der gesunden Kontrollpersonen befanden sich in den Wells 1-4, T-Zellen der Patienten in den Wells 5-8. Die Wells 3, 4, 7, 8 enthielten zusätzlich MSCs. In jedes Well wurden antigenpräsentierende Zellen pipettiert. Für die spätere Präparation von DNA/RNA wurden die Wells 3, 4, 7, 8 doppelt angelegt. Für die Experimente der Hauptversuche wurde eine 24-Well-Platte mit flachen Böden verwendet.

Die Zellzahlen ergaben sich aus den Erfahrungen und Ergebnissen der Vorexperimente und wurden wie folgt festgelegt (siehe Tabelle 16):

Tabelle 16: Verwendete Zellzahlen T-Zellen, APCs und MSCs

Naive CD4 ⁺ T-Zellen	2,5x10 ⁵ /Well
Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen	2,5x10 ⁵ /Well
APCs	0,5x10 ⁵ /Well
MSCs	0,25x10 ⁵ /Well

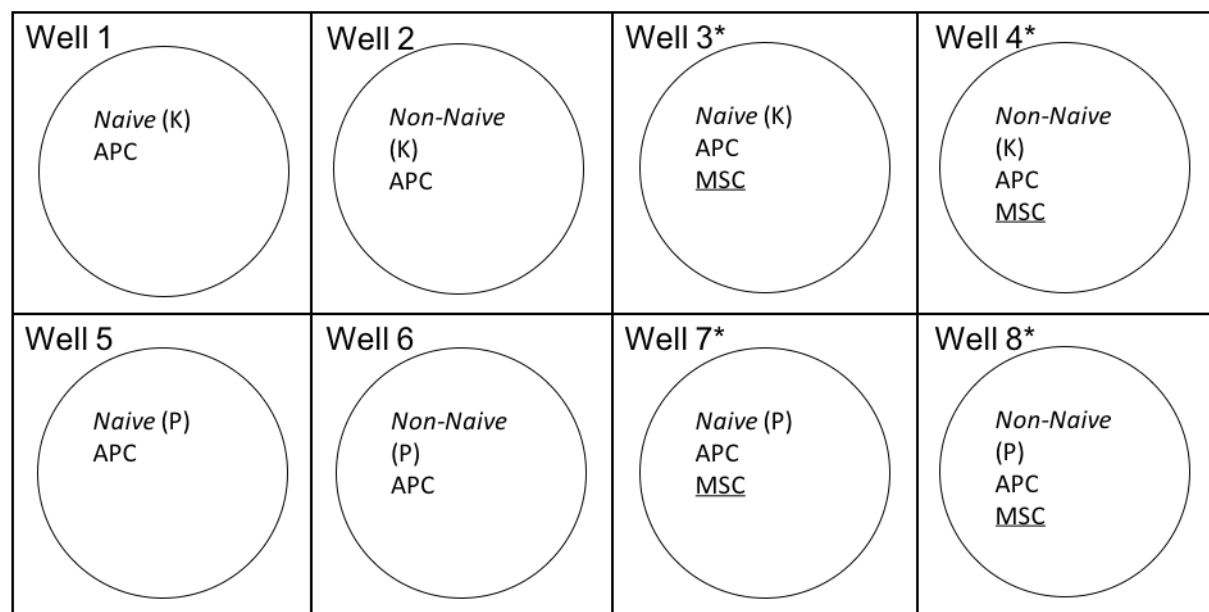


Abbildung 6

Konfiguration der Wells. Well 1-4 enthalten T-Zellen (Naive CD4⁺ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen) gesunder Probanden sowie antigenpräsentierende Zellen (APC). Well 3 und 4 enthalten zusätzlich MSCs. Well 5-8 beinhalten T-Zellen (Naive CD4⁺ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen) von Patienten. K = gesunde Kontrollprobanden; P = Patienten; Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen; Nicht-Naive = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen; * Doppelt angelegte Wells für RNA/DNA Präparation. Alle Wells wurden mit Anti-CD3/CD28 und dem Th17-Cocktail stimuliert. Die Konzentration der Stimuli kann Tabelle 17 und Tabelle 18 entnommen werden.

Problematisch zeigte sich die Separation der T-Zellsubpopulationen von den MSCs nach Ablauf der Inkubationszeit. Die Isolation der T-Zellen von den MSCs war erforderlich, da die Stammzellen die Aspiration der Probe bei der flowzytometrischen Messung behinderten. In den Vorexperimenten pipettierten wir T-Zellen direkt auf die am Boden der Wells adhären-ten MSCs und verwendeten vor der Messung im Flowzytometer einen feinporigen Nylon-Mesh-Filter mit der Porengröße 35µm für die Separation, welcher nur für T-Zellen, nicht aber für Stammzellen durchlässig war. Vor dem Hintergrund, die Interaktionen zwischen MSCs und T-Zell Subpopulationen besser zu verstehen, wurden in den Etablierungsversuchen Zell-

kulturen angelegt, die T-Zellsubpopulationen und MSCs nicht nur über direkten Zell-Zell-Kontakt, sondern auch ausschließlich über lösliche Faktoren im Zellkulturmedium kommunizieren lassen. Dazu eigneten sich Transwells®, die die MSCs von den T-Zellen durch eine Membran der Porengröße 0,4 µm räumlich trennen, jedoch Signalproteine und Entzündungsmediatoren durch die Membranporen ungehindert diffundieren lassen. Abbildung 7 veranschaulicht das Funktionsprinzip eines Transwells® schematisch.

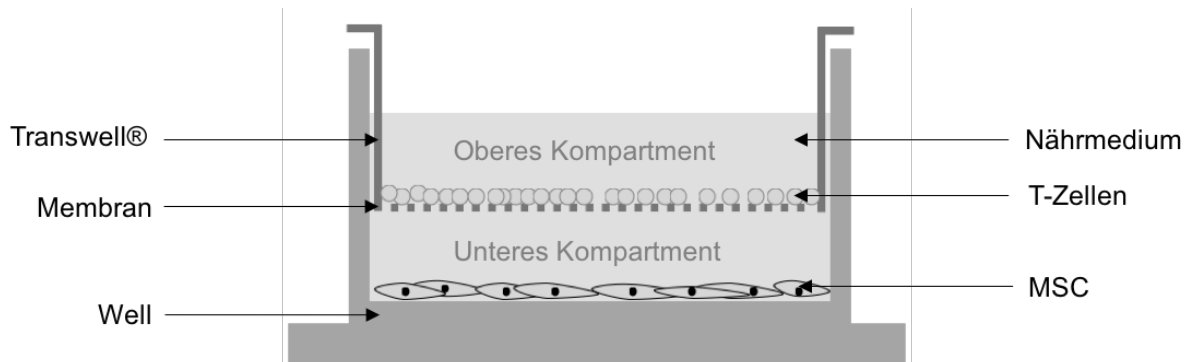


Abbildung 7

Well mit Transwell®. (modifiziert nach [167]). Im oberen Kompartiment auf der Membran befinden sich T-Zellen. Im Unteren Kompartiment am Boden des Wells befinden sich adhärente MSCs. T-Zellen und MSCs können über das Nährmedium miteinander kommunizieren. Direkter Zell-Zell-Kontakt ist nicht möglich.

3.2.5.7. T-Zell-Polarisierung

Durch einen Zytokincocktail erfolgte der Versuch Naive $CD4^+$ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen in Richtung Th17-Zellen zu polarisieren, um in den Wells ein proinflammatorisches Milieu zu schaffen. Anhand der Etablierungsversuche wurden Konzentration und Inkubationszeit der Zytokine so gewählt, dass die Zellen bei der späteren flowzytometrischen Messung eine möglichst hohe Zytokinproduktion und Überlebensrate aufwiesen. Tabelle 17 zeigt die verwendeten Zytokine und ihre Konzentrationen für die Stimulation der Zellkultur die einen Zeitraum von 6 Tagen umfasste. In den Hauptversuchen wurden sämtliche Zellkulturen nur einmal zu Beginn der Inkubationszeit stimuliert. Es erfolgte keine Restimulation.

Die alleinige T-Zell-Rezeptor Erkennung von an MHC gebundenen Antigenen scheint für eine suffiziente T-Zell-Proliferation nicht ausreichend zu sein. Die Interaktion des CD28 Rezeptors auf T-Zellen, mit dem B7 Rezeptor auf antigenpräsentierenden Zellen, bewirkt ein kostimulatorisches Signal für die klonale Expansion der T-Zellen [168]. Als Transmembranprotein an der Zelloberfläche spielt CD3 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung in dem es mit dem T-Zell-Rezeptor einen Komplex bildet und die Proliferationsrate der Effektor- und

Naiven CD4⁺ T-Zellen erhöht [169]. Die Kostimulation erfolgte daher mit Anti-CD28- und Anti-CD3-Antikörpern und der Endkonzentration 1 µg/ml (siehe Tabelle 18).

Tabelle 17: Th17 Cocktail zur Polarisierung Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th17 Zellen

Th17 Cocktail	
Zytokin	Endkonzentration
IL-1β	10ng/ml
IL-6	20ng/ml
TGFβ	5ng/ml
IL-23	100ng/ml

Tabelle 18: Kostimulation zur Aktivierung Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen

T-Zell-Kostimulation	
Kostimulator	Endkonzentration
Anti-CD28-Antikörper	1µg/ml
Anti-CD3-Antikörper	1µg/ml

3.2.5.8. DNA/RNA Präparation

Für die Präparation von DNA/RNA aus MSCs und T-Zellen wurden die Zellkulturplatten für 5 Minuten bei 260g zentrifugiert und die Zellsuspensionen der doppelt angelegten Wells in sterile DNA-Schraubröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation der Schraubröhrchen bei 710g erfolgte die Resuspension mit 350µl RLT-Puffer und das Einfrieren der Zellen bei -20°C. Die

Weiterverarbeitung der Zellen und die DNA-/RNA-Präparation wurde durch Mitarbeiter des Labors durchgeführt. Die Zellen und DNA/RNA Proben wurden für nachfolgende Fragestellungen, die nicht mehr Gegenstand der Promotionsarbeit waren, asserviert.

3.2.6. Flowzytometrie

3.2.6.1. Überblick

Durch Flowzytometrie ist es möglich, physikalische Eigenschaften einzelner Partikel, meistens Zellen, gleichzeitig zu messen und zu analysieren. Die Zellen werden dafür über ein Flüssigkeitssystem in einen Laserstrahl eingebracht. Das einfallende Licht wird durch die in der Probe befindlichen, mit fluoreszierenden Antikörpern markierten, Zellen gestreut und die emittierte Fluoreszenz kann elektronisch detektiert werden. Die elektronischen Signale sind proportional zu den optischen Signalen die von den Partikeln oder Zellen ausgesendet werden. Damit kann die relative Größe, Körnung, sowie die Intensität der Fluoreszenz eines Partikels oder einer Zelle gemessen werden [170]. Abbildung 8 gibt einen Überblick des technischen Ablaufes der flowzytometrischen Messung.

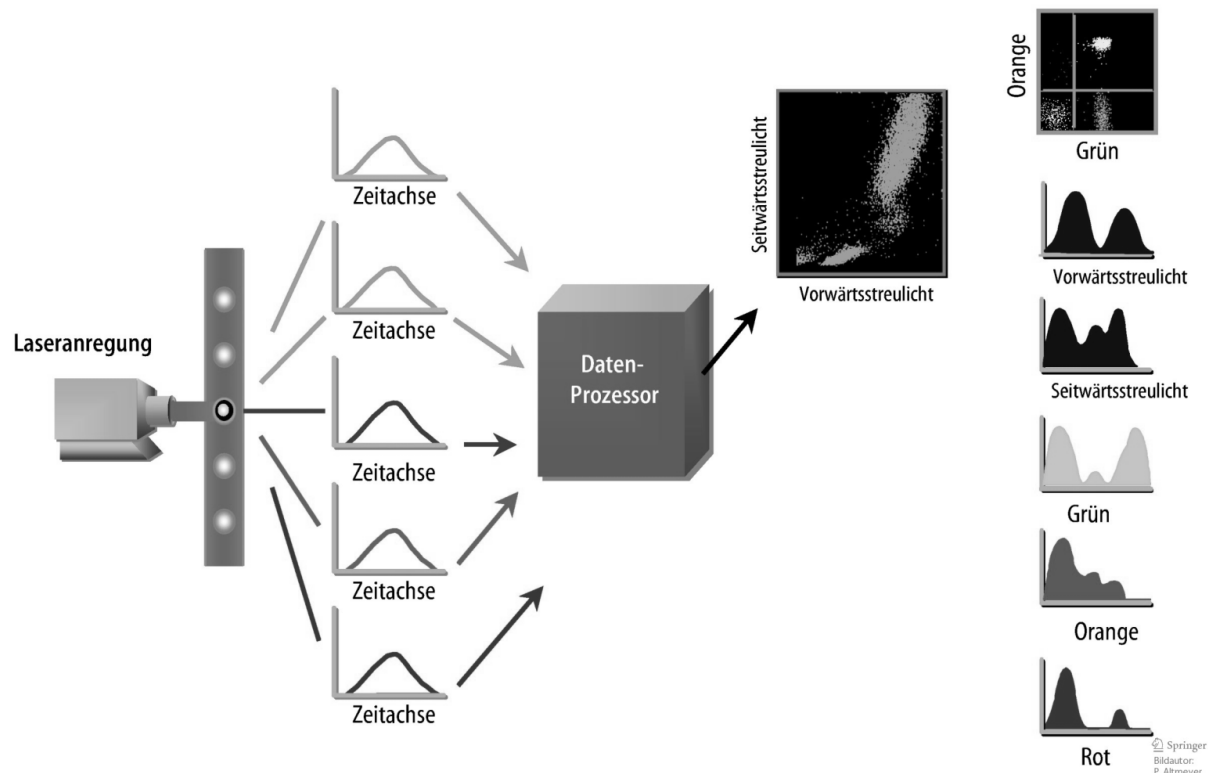


Abbildung 8

Technischer Ablauf der flowzytometrischen Analyse (modifiziert nach [171]). Gestreute und emittierte Lichtsignale werden in elektronische Impulse umgewandelt, die durch einen Computer weiterverarbeitet werden.

Bestandteile einer Zelle wie die Zellmembran, der Zellkern sowie Speicher-Granula im Zellinneren beeinflussen das Laserstreulicht ebenso, wie die Zellform und die Oberflächentopographie der Zelle.

Vorwärtsstreuung ist proportional zur Zelloberfläche bzw. Zellgröße und wird parallel zur Achse des einfallenden Laserlichts von einer Photodiode registriert. Damit stellt Vorwärtsstreuung (FSC = Forward Scatter) eine geeignete Methode dar, um Zellen mit einer bestimmten Größe, unabhängig von ihrem Fluoreszenzmuster, zu erfassen. Seitenstreuung (SSC = Sideways Scatter) ist proportional zur Zellkörnung und inneren Komplexität einer Zelle. Anders als Vorwärtsstreuung, welches sich meistens als abgelenktes Licht darstellt, zeigt Seitenstreuung vermehrt gebrochenes und von den Zellen reflektiertes Licht. Die Erfassung von Seitenstreuung erfolgt im Winkel von ungefähr 90° zur Lichtquelle durch eine Sammellinse und wird anschließend durch einen Strahlenteiler zum geeigneten Detektor umgeleitet (siehe Abbildung 9).

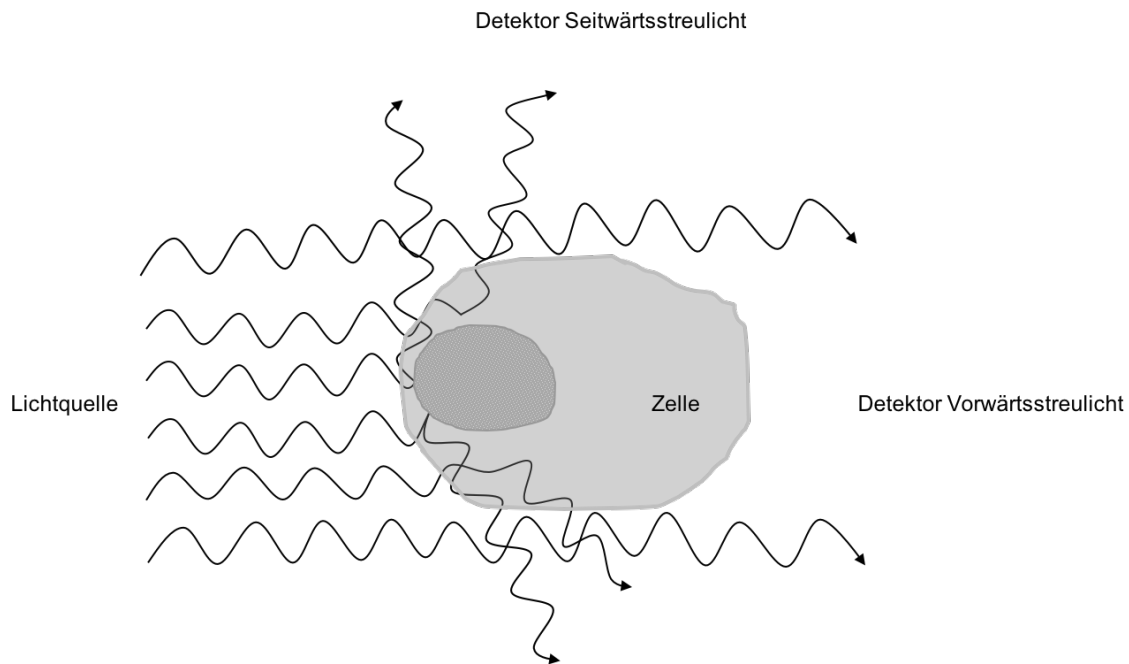


Abbildung 9

Laserstreuung beim Auftreffen auf eine Zelle (modifiziert nach [170]). Das Licht des einfallenden Laserstrahls lässt sich in Seitwärtsschattered und Vorwärtsschattered unterteilen und von unterschiedlichen Detektoren erfassen.

Korreliert man die Messungen des Vorwärts- und Seitwärtsschattered, erlaubt dies eine Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen einer heterogenen Zellpopulation. Damit lassen sich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten voneinander abgrenzen [170].

3.2.6.2. Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Das Anfärben von Antigenen der Zelloberfläche diente der späteren Phänotypisierung einzelner T-Zell Subpopulationen. Durch die Oberflächenantigene CD45RA und CD27 ließen sich TEMRA-, Gedächtnis-, Effektor-, und Naive-Zellen voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 19). Durch die in Kapitel 3.2.6.3. beschriebene Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung konnte neben der Zytokinproduktion, die Proliferationsaktivität und Apoptoserate für jede T-Zell Subpopulation bestimmt werden. Tabelle 21 zeigt das Färbeprotokoll sowohl für die Phänotypisierung, als auch für die Bestimmung intrazellulär produzierter Zytokine. Durch die Marker Ki-67 und Annexin/7-ADD konnten Proliferationsaktivität und Apoptoserate gemessen werden.

Tabelle 19: Phänotypisierung der T-Zell Subpopulationen anhand der Oberflächenantigene CD45RA und CD27

T-Zell Subpopulation	Exprimierte Oberflächenantigene
Naive-Zellen	CD45RA ⁺ CD27 ⁺
Gedächtnis-Zellen	CD45RA ⁻ CD27 ⁺
Effektor-Zellen	CD45RA ⁻ CD27 ⁻
TEMRA-Zellen	CD45RA ⁺ CD27 ⁻

Dargestellt sind die vier untersuchten T-Zell Subpopulationen (Naive-, Gedächtnis-, Effektor- und TEMRA-Zellen), sowie die exprimierten Oberflächenantigene CD45RA und CD27. + = Oberflächenantigen wird exprimiert; - = Oberflächenantigen wird nicht exprimiert.

Für die Oberflächenfärbung wurde die Zellkultur nach Ablauf der Inkubationszeit unter dem Mikroskop kontrolliert und anschließend bei 260g für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgte die Abnahme von 250µl Überstand aus jedem einzelnen Well für die spätere Durchführung eines ELISAs durch eine Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Prelog. Die Überstände wurden in ein nummeriertes steriles Eppendorf AG Tube pipettiert und bei -20°C eingefroren. Aus den doppelt angelegten Wells extrahierten wir MSCs und T-Zellen für die DNA/RNA Präparation welche anschließend, wie in Kapitel 3.2.5.8. DNA/RNA Präparation beschrieben, in die DNA-Schraubröhrchen pipettiert wurden. Vor der Immunfluoreszenzfärbung schloss sich eine dreistündige Stimulation der Zellen mit der in Tabelle 20 gezeigten Stimulantien an. Die Zellen waren nach Zugabe von PMA, BFA und Ionomycin bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von BFA hat einen hemmenden Effekt auf die Zellsekretion bei erhaltener Proteinbiosynthese [172]. Produzierte Zytokine akkumulieren somit innerhalb der Zelle und können flowzytometrisch gemessen werden. PMA und Ionomycin wirken synergistisch und steigern über die Aktivität der Proteinkinase C die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen [173].

Tabelle 20: Verwendete Stimuli vor Immunfluoreszenzfärbung

Stimuli	Endkonzentration
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	15ng/ml
Ionomycin	1µg/ml
Brefeldin A (BFA)	5µg/ml

Zur Oberflächenfärbung der T-Zellen wurden für jedes Well vier FACS Round Bottom Tubes mit je 200µl FACS-Puffer vorbereitet und die Zellsuspensionen der einzelnen Wells auf die Tubes gleichmäßig aufgeteilt. Für jedes Well wurde vier verschiedene Fluoreszenzfärbungen, die jeweils extrazelluläre und intrazelluläre Strukturen der Zellen anfärben, geplant. zeigt eine Übersicht der einzelnen Färbungen. In jedes Tube wurde zunächst 1ml FACS-Puffer pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 50µl FACS-Puffer und 1µl fluoreszenzmarkierter Antikörper pro Tube. Die einzelnen Antikörper einer Färbung wurden dabei in Form eines Mastermix zusammengefasst. Es erfolgte die Inkubation bei 4°C für 30 Minuten. Durch einen Waschschrift mit 1ml PBS und fünfminütiger Zentrifugation bei 400g ließ sich nicht gebundener Antikörper aus der Probe entfernen. Die Zellen wurden für die nachfolgende intrazelluläre Färbung zunächst in 250µl Cytofix pro Tube für 20 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente der Fixierung der extrazellulären Färbung.

3.2.6.3. Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Die intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung diente der Quantifizierung produzierter Zytokine der einzelnen T-Zell Subpopulationen als auch der Erfassung FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen. Nach vorangegangener Oberflächenfärbung erfolgte zunächst ein weiterer Waschschrift mit 1ml Permeabilisierungs-Puffer und darauffolgender Zentrifugation bei 400g für 5 Minuten. Die erneute Resuspension wurde unter Zugabe von 50µl Permeabilisierungs-Puffer und 1µl fluoreszenzmarkierter Antikörper pro Tube durchgeführt. Wie bei der extrazellulä-

ren Färbung wurde erneut für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mit 1ml Permeabilisierungs-Puffer gewaschen. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 400g und Resuspension in 350µl FACS-Puffer waren die Zellen für die flowzytometrische Messung vorbereitet.

3.2.6.4. Proliferations- und Apoptose-Färbung

In Co-Kultur mit T-Zellen scheinen MSCs auch einen Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen zu haben. Die Proliferationsaktivität der T-Zellen kann durch den Marker Ki-67 bestimmt werden. Während Ki-67 in der Interphase ausschließlich im Nucleus lokalisiert ist, verlagert es sich während der Mitose auf die Chromosomenoberfläche und erscheint in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G (1), S, G (2) und Mitose, nicht jedoch im Zellzyklus-Arrest (G (0))). Diese Eigenschaft macht Ki-67 zu einem exzellenten Marker für die proliferierende Fraktion einer Zellpopulation [174]. Die Bestimmung von Ki-67 erfolgte im Rahmen der intrazellulären Fluoreszenzfärbung (siehe Kapitel 3.2.6.3. Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung).

Neben der Proliferationsaktivität sollte auch die Zellviabilität der T-Zellen sowohl in Co-Kultur mit MSCs als auch ohne MSCs gemessen werden. Mit der Apoptose-Färbung Annexin V/7-AAD konnten apoptotische und nekrotische Zellen identifiziert werden. Beim programmierten Zelltod wird nach Caspase-Aktivierung Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exprimiert und kann durch fluorchromgelabeltes Annexin V markiert werden. Die Differenzierung zwischen lebendigen und toten Zellen als auch die Erkennung von Apoptosefrühstadien sind dadurch möglich. Für die weitere Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen ist 7-amino-actinomycin D (7-ADD) erforderlich. Nekrotische Zellen und Zellen in der Spätphase der Apoptose weisen eine erhöhte Membranpermeabilität auf, die es 7-AAD erlaubt, eine Bindung mit der DNA im Zellkern einzugehen [175]. Für die Apoptose-Färbung wurde die Zellsuspension in 1ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 50µl Annexin V Binding Buffer. Nach Zugabe von 1µl Annexin V FITC und 1µl 7-ADD APC betrug die Inkubationszeit 15 Minuten bei 4°C. Bevor die Zellen in 350µl FACS-Puffer resuspendiert werden konnten, wurden sie in 500µl Annexin-Binding-Buffer gewaschen und 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Die Messung am Flowzytometer erfolgte unverzüglich.

3.2.7. Statistik

Aufgrund bestehender Probandenzahlen war eine Normalverteilung der gewonnenen Daten nicht anzunehmen. Die statistische Auswertung erfolgte daher nichtparametrisch durch den Mann-Whitney-U-Test. Damit konnten signifikante Unterschiede in den Parametern Phänotyp, Proliferation, Apoptose, Zytokinproduktion und Chemokinexpression für zwei unabhängige Variablen bestimmt werden (z.B. Zellkultur *ohne* MSCs und Zellkultur *mit* MSCs). Die elektronische Berechnung der Datensätze sowie die Erstellung von Diagrammen erfolgte durch das Programm IBM SPSS Statistics Version 22 (Armonk, New York, USA). Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt.

Tabelle 21: Extra- und Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Färbung	Farbstoff							
	PE-Cy7	PerCP-Cy5.5	APC	BV421	FITC	AF700	PE	APC-Cy7
Färbung 1	CD27	CCR6	CD161	CD45RA	IFN γ	IL-17	IL-9	-
Färbung 2	-	FoxP3	IL-10	CD127	CD25	-	CD62L	-
Färbung 3	CD27	CXCR3	CCR5	CD45RA	Ki-67	-	IL-13	CCR5
Färbung 4 (Apoptose)	-	-	7-ADD	-	Annexin V	-	-	-

Färbepanel zur Phänotypisierung und Messung der Parameter Zytokinproduktion, Proliferation, Apoptose und Chemokinrezeptorexpression.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit kann in folgende zwei Hauptkapitel gegliedert werden: Etablierungsversuche zur Etablierung der Methode und Hauptversuche mit Patientenproben im Sinne eines explorativen, hypothesen-generierenden Ansatzes.

Etablierungsversuche

Für die Etablierungsversuche wurden zunächst Naive $CD4^+$ T-Zellen aus buffy coats und Vollblut gesunder Spender isoliert. Als buffy coat wird eine Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten zwischen Plasma und sedimentierten Erythrozyten bezeichnet, die sich nach längerem Stehen oder Zentrifugieren von ungerinnbar gemachtem Blut ausbildet [176].

Naive $CD4^+$ T-Zellen sollten durch Th17-Stimulation und Kostimulation mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern in Richtung Th17-Zellen polarisiert werden. Mittels Co-Kultur- und Transwell®-Experimenten, wurde der Einfluss der MSCs auf Phänotyp, Proliferation, Apoptose, Zytokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression polarisierter Naiver $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Da im Verlauf der Etablierungsversuche gezeigt werden konnte, dass der Hauptanteil an produzierten proinflammatorischen Zytokinen von Memory- und Effektor-Zellen ausgeht, wurden die Experimente im Verlauf zusätzlich mit Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen durchgeführt.

Hauptversuche

Für die Hauptversuche (siehe Kapitel 4.2. Charakteristik Patienten, gesunde Probanden und MSC-Spender bis Kapitel 4.5. Zytokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression) wurden PBMCs aus Patienten mit autoimmun bedingter Arthritis im Rahmen von rheumatischen Erkrankungen und von gesunden Kontrollprobanden gewonnen. Nachfolgend wurden Naive $CD4^+$ T-Zellen und Nicht-Naive $CD4^+$ T-Zellen isoliert und wie in den Etablierungsversuchen in Richtung Th-17 Zellen stimuliert. In Transwell®-Experimenten mit MSCs, wurde anschließend analysiert, inwieweit sich die Naive und Nicht-Naive Zellfraktion von Patienten und gesunden Probanden bezüglich Phänotyp, Proliferation, Apoptose, Zytokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression unterscheiden.

4.1. Etablierungsversuche

4.1.1. Etablierungsversuchsreihe 1: Co-Kultur Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs

Etablierungsversuch 1 + 2

Zu Beginn der Etablierungsversuche sollte ein Co-Kultursystem bestehend aus MSCs und isolierten Naiven CD4⁺ T-Zellen etabliert werden. Für die Isolierung Naiver CD4⁺ T-Zellen wurden zunächst PBMCs aus Buffy coats (BCs) gesunder Kontrollpersonen verwendet. Die Isolierung Naiver CD4⁺ T-Zellen erfolgte durch MACS® Separation und ist in Abschnitt 3.2.5.5. beschrieben. Die primären Ziele bei der Etablierung des Co-Kultursystems waren neben der Bestimmung einer geeigneten MSC/T-Zell-Ratio, die Erhaltung der Zellvitalität und die Gewährleistung einer suffizienten Proliferation in den Kontrollwells ohne MSCs. Weiterhin sollte die Th17-Polarisierung eine verstärkte Produktion proinflammatorischer Zytokine isolierter Naiver T-Zellen bewirken. Abbildung 10 zeigt die Konfiguration der Zellkultur in einer 24-Well-Platte für den ersten und zweiten Etablierungsversuch. Die Zellratio Naiver CD4⁺ T-Zellen/MSCs betrug 10:1.

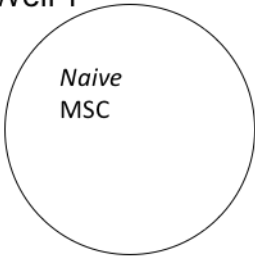
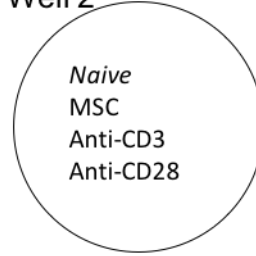
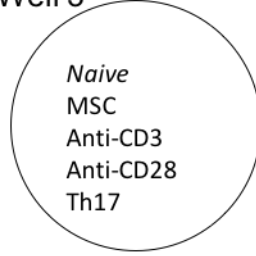
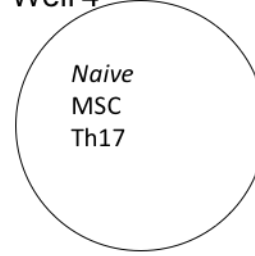
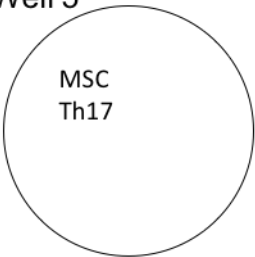
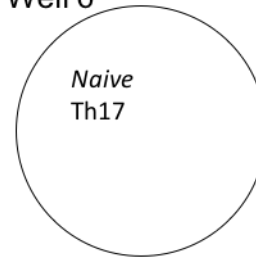
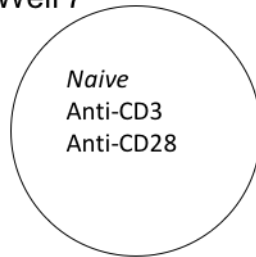
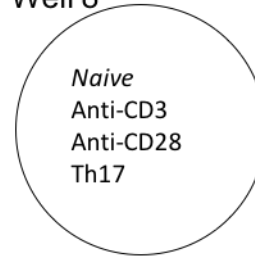
Well 1 	Well 2 	Well 3 	Well 4 
Well 5 	Well 6 	Well 7 	Well 8 

Abbildung 10

Gezeigt sind 8 unterschiedlich konfigurierte Wells. In Well 1-4 befinden sich Naive CD4⁺ T-Zellen und MSC in Co-Kultur. Die Wells 2-4 werden unterschiedlich stimuliert. In Well 5 befinden sich nur MSCs, die mit einem Th17-Cocktail stimuliert werden. Well 6-8 dienen als Kontrollwells und enthalten Naive CD4⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Stimuli. Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen; Zellratio: Naive CD4⁺ T-Zellen/MSCs 10:1. Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper; Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Die Zellkultur wurde für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die anschließende lichtmikroskopische Kontrolle diente der Beurteilung der Zellproliferation und Zellmorphologie in den einzelnen Wells.

Vor der flowzytometrischen Messung erfolgte die Stimulation mit PMA (30ng/ml), Ionomycin (1µg/ml) und BFA (10µg/ml) für weitere 3 Stunden im Brutschrank. Die Separation der T-Zellen von den MSCs wurde durch einen feinporigen Nylon Mesh Filter durchgeführt.

Eine suffiziente Proliferation in den Kontrollwells 6, 7 und 8 in Abbildung 10 war Voraussetzung für die weitere Analyse des T-Zell-Phänotyps, der Apoptose, der Zytokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression. Zur flowzytometrischen Quantifizierung der T-Zellproliferation wurde der Marker Ki-67 verwendet.

In der lichtmikroskopischen Kontrolle und flowzytometrischen Auswertung, der in Abbildung 10 gezeigten Zellkultur, konnte weder in Co-Kultur mit MSCs noch in den Kontrollwells eine gesteigerte T-Zellproliferation festgestellt werden. Auch die Wiederholung dieses Experimentes ergab keine Veränderung bezüglich der T-Zellproliferation.

In beiden Experimenten wurde ein erhöhter Anteil toter T-Zellen von über 90% bei der flowzytometrischen Messung registriert. Insgesamt war die Zellzahl zu gering, um eine gültige Aussage vorhandener Unterschiede hinsichtlich Proliferation, Apoptose, Phänotyp oder Zytokinproduktion in den einzelnen Wells treffen zu können.

Die Resultate der ersten beiden Experimente sind in Abbildung 11 anhand zweier FACS-Plots exemplarisch dargestellt. Da in dieser Arbeit die Beeinflussung der T-Zellen durch MSCs untersucht wurde und nicht umgekehrt, wurde die flowzytometrische Charakterisierung der MSCs im Verlauf der Etablierungsversuche und in den Hauptversuchen nicht weiterverfolgt. Aus diesem Grund soll auf Well 5 nicht weiter eingegangen werden.

Der Vollständigkeit halber kann die Auswertung von Versuch 2 dem Anhang entnommen werden.

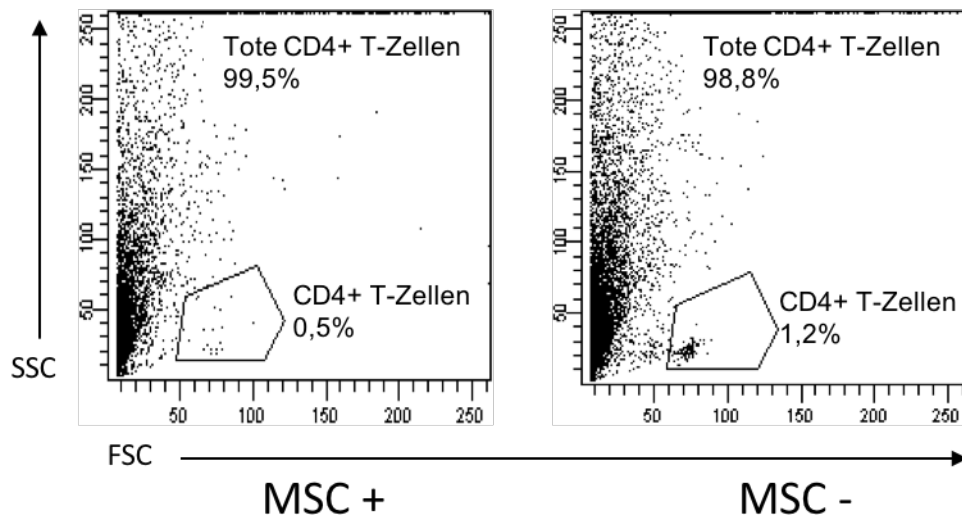


Abbildung 11

Dargestellt ist der hohe Anteil toter CD4+ T-Zellen in Gegenwart (MSC+) und Abwesenheit (MSC-) von MSCs bei der flowzytometrischen Messung. SSC = Sideways-Scatter; FSC = Forward-Scatter.

Etablierungsversuch 3

Aufgrund der zu geringen Zellzahlen an Naiven CD4⁺ T-Zellen in den beiden ersten Experimenten wurde die Zellzahl im dritten Experiment von $2,5 \times 10^5$ /Well auf $5,0 \times 10^5$ /Well erhöht, unter Beibehaltung der Zellkulturkonfiguration aus den beiden vorhergehenden Versuchen.

Die lichtmikroskopische Kontrolle der Zellkultur zeigte nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen erneut kaum Proliferationsaktivität der T-Zellen. Die Zellen wurden mittels Th17-Cocktail und Anti-CD3-/Anti-CD28-Antikörpern restimuliert und für weitere 4 Tage inkubiert. Am 7. Tag erfolgte die flowzytometrische Messung und die Bestimmung der Proliferation. Wie in den Experimenten zuvor kam es weder in Co-Kultur mit MSCs, noch in den Kontrollwells zu einer gesteigerten T-Zell Proliferation (siehe Tabelle 43 im Anhang).

Etablierungsversuch 4

Um die Dichte der T-Zellen in den Wells zu erhöhen, wurde in Etablierungsversuch 4 eine 48- und eine 96-Well-Platte anstelle der 24-Well-Platte verwendet. Da eine ausreichende T-Zellproliferation für die weitere Untersuchung des Einflusses der MSCs auf die T-Zellen Grundvoraussetzung war, wurden zunächst nur die Kontrollwells 7 und 8 aus Abbildung 10

angelegt und auf eine Co-Kultur mit MSCs verzichtet, bis eine ausreichende Proliferation in den Kontrollwells gegeben war.

Abbildung 12 zeigt die Konfiguration der doppelt angelegten Kontrollwells 7 und 8 in einer 48- und 96-Well-Platte mit jeweils unterschiedlicher Zellzahl und unterschiedlicher Stimulation.

48-Well-Platte		96-Well-Platte	
Well 7	Well 7	Well 7	Well 7
<div>Naive (1 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28</div>	<div>Naive (0,5 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28</div>	<div>Naive (0,1 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28</div>	<div>Naive (0,2 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28</div>
Well 8	Well 8	Well 8	Well 8
<div>Naive (1 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28 Th17</div>	<div>Naive (0,5 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28 Th17</div>	<div>Naive (0,1 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28 Th17</div>	<div>Naive (0,2 x 10⁶) Anti-CD3 Anti-CD28 Th17</div>

Abbildung 12

Gezeigt sind jeweils 4 unterschiedlich konfigurierte Wells einer 48- und einer 96-Well-Platte.

In der 48- und der 96-Well-Platte sind Well 7 und 8 jeweils doppelt angelegt und weisen unterschiedliche Zellzahlen auf (jeweils in Runden Klammern () dargestellt). Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen; Well 7 und 8 unterscheiden sich durch die unterschiedliche T-Zell-Stimulation (Well 7 ohne Th17-Stimulation; Well 8 mit Th17-Stimulation).

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;

Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Erneut ließ sich trotz einer Verlängerung der dreitägigen Inkubationszeit um 2 Tage und anschließender Restimulation keine ausreichende Proliferation der Kontrollwells beobachten (siehe Tabelle 44 im Anhang).

4.1.2. Etablierungsversuchsreihe 2: Co-Kultur Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs + APCs

Etablierungsversuch 5

Während für die Aktivierung CD4⁺ T-Gedächtniszellen in Hinblick auf Proliferation und Zytokinsekretion nur der T-Zell-Rezeptor-Komplex erforderlich ist, scheint für die Aktivierung Naiver CD4⁺ T-Zellen ein zusätzliches Signal antigenpräsentierender Zellen (APCs) notwendig zu sein [10]. Basierend auf dieser Hypothese, wurde zur Steigerung der T-Zellproliferation, die in Abbildung 13 gezeigte Zellkultur mit APCs etabliert.

APCs wurden in den Etablierungsversuchen aus Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen durch Bestrahlung mit 30 Gy gewonnen. Das detaillierte Procedere des Bestrahlungsablaufes erfolgte analog zu den Hauptversuchen und kann Kapitel 3.2.5.6. Co-Kultur MSC und T-Zellen entnommen werden.

Well 1 Naive	Well 2 Naive Anti-CD3 Anti-CD28	Well 3 Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28	Well 4 Naive Anti-CD3 Anti-CD28 IL-2	Well 5 Naive Anti-CD3 Anti-CD28 IL-7
Well 6 Naive Anti-CD3 Anti-CD28 IL-2 + IL-7	Well 7 Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28 IL-2	Well 8 Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28 IL-7	Well 9 Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28 IL-2 + IL-7	Well 10 Naive APC

Abbildung 13

Gezeigt sind 10 unterschiedlich konfigurierte Wells. Die Wells 3, 7, 8, 9 und 10 enthalten neben Naiven CD4⁺ T-Zellen (Naive) auch antigenpräsentierende Zellen (APCs). Zellratio Naive/APCs: 1:1. Zellzahl Naive und APCs: $2,5 \times 10^5$.

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper; IL-7 = 20 ng/ml; IL-2 = 20 ng/ml

Nach 3 Tagen Inkubationszeit, ließ sich in den Wells 3, 7, 8 und 9 bereits lichtmikroskopisch eine deutlich gesteigerte Proliferation in Form von Proliferationsclustern beobachten. Die gesteigerte T-Zellproliferation in den Wells mit APCs und Anti-CD3/CD28-Stimulation ließ sich auch flowzytometrisch nachweisen (siehe Tabelle 45 im Anhang) und ist exemplarisch in Abbildung 14 dargestellt.

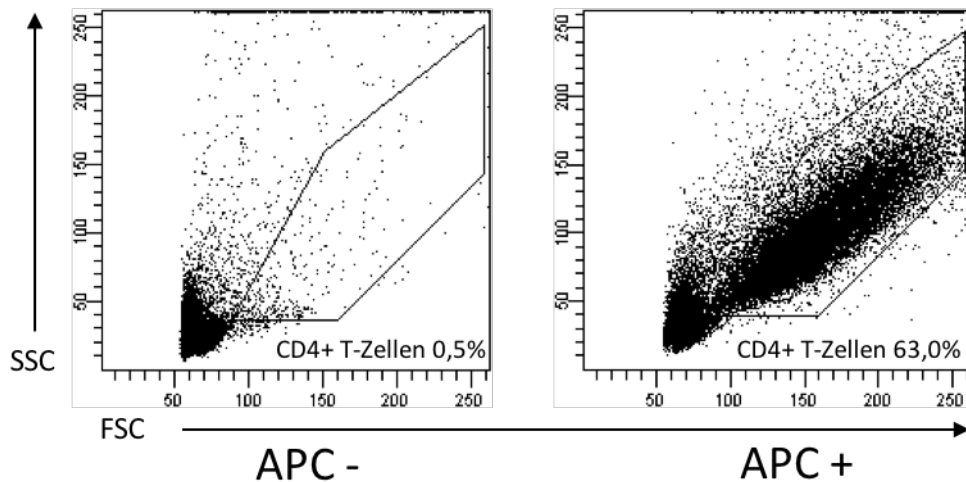


Abbildung 14

Dargestellt ist der hohe Anteil toter CD4⁺ T-Zellen ohne antigenpräsentierende Zellen (APC-) und der gesteigerte Anteil CD4⁺ T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen (APC+).
SSC = Sidewards-Scatter; FSC = Forward-Scatter.

Etablierungsversuch 6-10

Da durch die APCs eine ausreichende Proliferation der Naiven Zellen in den Kontrollwells gegeben war, konnten die Co-Kultur-Experimente mit MSCs fortgeführt werden und der Einfluss der MSCs auf die Apoptose, den Phänotyp und das Zytokinprofil der isolierten Naiven T-Zellen untersucht werden.

Well 1 MSC Naive APC	Well 2 MSC Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28	Well 3 MSC Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28 Th17	Well 4 MSC Naive APC Th17	Well 5 MSC Th17
Well 6 Naive Th17	Well 7 Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28	Well 8 Naive APC Anti-CD3 Anti-CD28 Th17	Well 9 Naive APC Th17	Well 10 Naive APC

Abbildung 15

Gezeigt sind 10 unterschiedlich konfigurierte Wells. Die Wells 1-5 enthalten MSCs. Die Wells 6-10 enthalten keine MSCs. Die Wells 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 und 10 enthalten antigenpräsentierende Zellen (APCs). Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen.

Zellratio Naive/APCs: 1:1; Zellratio Naive/MSC: 10:1. Zellzahl MSCs: $2,5 \times 10^4$; Zellzahl Naive und APCs: $2,5 \times 10^5$.
Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;
Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Anhand der in Abbildung 15 gezeigten Zellkultur, wurden isolierte Naive T-Zellen in Co-Kultur mit MSC und unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit Kontrollwells ohne MSCs verglichen.

Die Veränderung des Phänotyp Naiver $CD4^+$ T-Zellen äußerte sich durch den Einfluss der MSC nach Th17 Stimulation in einem verminderten prozentualen Anteil $CD45RA^-CD27^+$ Gedächtnis-Zellen, $CD45RA^-CD27^-$ Effektor-Zellen und $CD45RA^+CD27^-$ TEMRA-Zellen unter Beibehaltung des Naiven Phänotyps ($CD45RA^+CD27^+$) im Vergleich zu den Kontrollwells ohne MSCs (siehe Tabelle 46 im Anhang).

Eine deutlich gesteigerte T-Zellproliferation konnte in den Kontrollwells 7 und 8 festgestellt werden. In den korrespondierenden Wells 2 und 3 mit MSCs war die Proliferation hingegen deutlich vermindert. So lag der durchschnittliche prozentuale Anteil proliferierender Ki-67 positiver $CD4^+$ T-Zellen bei 45,7% in Well 8 ohne MSCs, während er in Well 3 mit MSCs 24,2% betrug.

Ohne die Kostimulatoren Anti-CD3-/Anti-CD28-Antikörper, konnte in den Wells 9 und 10 keine gesteigerte Proliferation Naiver T-Zellen beobachtet werden. Erhöhte Proliferationsaktivität war in den Wells 1, 4 und 6 ebenfalls nicht zu erkennen.

Im Anhang ist die Proliferation nur für Well 3 (mit MSCs) und 8 (ohne MSCs) der Etablierungsversuche 6-10 gezeigt, da die Konfiguration dieser Wells aufgrund einer „idealen“ Proliferation des Kontrollwells später in den Hauptversuchen übernommen wurde (siehe Tabelle 47 im Anhang).

Die Apoptoserate Naiver $CD4^+$ T-Zellen wurde in Co-Kultur mit MSCs tendenziell herabgesetzt. Analog zur Bestimmung der Proliferation wurde die Apoptose in Well 3 (mit MSCs) und Well 8 (ohne MSCs) gemessen (siehe Tabelle 48 im Anhang). In Well 3 betrug der durchschnittliche prozentuale Anteil Annexin V + 7AAD - $CD4^+$ T-Zellen 3,6% während er in Well 8 4,2% betrug.

MSCs inhibierten nicht nur Proliferation und Apoptose isolierter Naiver $CD4^+$ T-Zellen, sondern auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine in den vier Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektorzellen. Im Vergleich zum Kontrollwell war der prozentuale

Anteil IFN γ - und IL-17-produzierender CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von MSCs in allen vier Phänotypen vermindert. Die einzelnen Zahlenwerte können in Tabelle 49 im Anhang eingesehen werden.

Der Einfluss der Th17 Stimulation auf MSCs in Well 5 wurde in dieser Arbeit wie schon erwähnt, nicht weiterverfolgt.

Das Experiment in Abbildung 15 wurde insgesamt viermal wiederholt und die Zellzahl der APCs ab der ersten Wiederholung von $2,5 \times 10^5$ auf $5,0 \times 10^4$ reduziert.

4.1.3. Etablierungsversuchsreihe 3: Co-Kultur und Transwell®-Experimente

Nachdem PBMCs in den Etablierungsversuchen bisher aus buffy coats isoliert wurden, erfolgte in der dritten Etablierungsversuchsreihe die Isolierung der PBMCs aus dem Vollblut gesunder Probanden, die einer Blutentnahme nach vorheriger Aufklärung ausdrücklich zustimmten.

Zusätzlich zu Naiven CD4⁺ T-Zellen wurden die Experimente mit Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen durchgeführt.

Außerdem sollte durch Transwell®-Systeme untersucht werden, ob MSCs ihre Effekte auch über lösliche Faktoren auf Naive und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen ausüben können oder direkten Zell-Zell-Kontakt benötigen.

Letztlich wurde der Frage nachgegangen, wie sich MSCs auf bereits proinflammatorisch vorstimulierte Naive und Nicht-Naive T-Zellen auswirken können.

Etablierungsversuch 11 und 12

Das Schema der durchgeführten Experimente zeigt Abbildung 16. Es wurden jeweils Naive und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Kombination mit MSCs und APCs kultiviert; korrespondierende Wells ohne MSCs dienten als Kontrollwells.

Die flowzytometrische Auswertung der Wells 1-4 sowie 7 und 8 erfolgte nach 6 Tagen. Well 5 und 6 wurden jeweils aufgeteilt, mittels Th17-Cocktail und Anti-CD3-/Anti-CD28-Antikörpern restimuliert und mit MSCs, einerseits als Co-Kultur (Well 9 und 11) und andererseits als Transwell®-System (Well 10 und 12) für weitere 6 Tage inkubiert. Nach insgesamt 12 Tagen Inkubationszeit, wurden die Wells 9-12 flowzytometrisch gemessen.

Wie in den Etablierungsversuchen 6-10 wurden Phänotyp, Proliferation, Apoptose und das Zytokinprofil mit und ohne MSCs bestimmt. Zusätzlich wurde in Etablierungsversuch 11 und 12 die Chemokinrezeptorexpression ermittelt. Das Experiment in Abbildung 16 ließ sich mit T-Zellen eines weiteren gesunden Probanden reproduzieren.

Die Konzentrationen der verwendeten Stimulantien und die Zellratio bzw. Zellzahlen wurden ebenfalls in den Hauptversuchen verwendet.

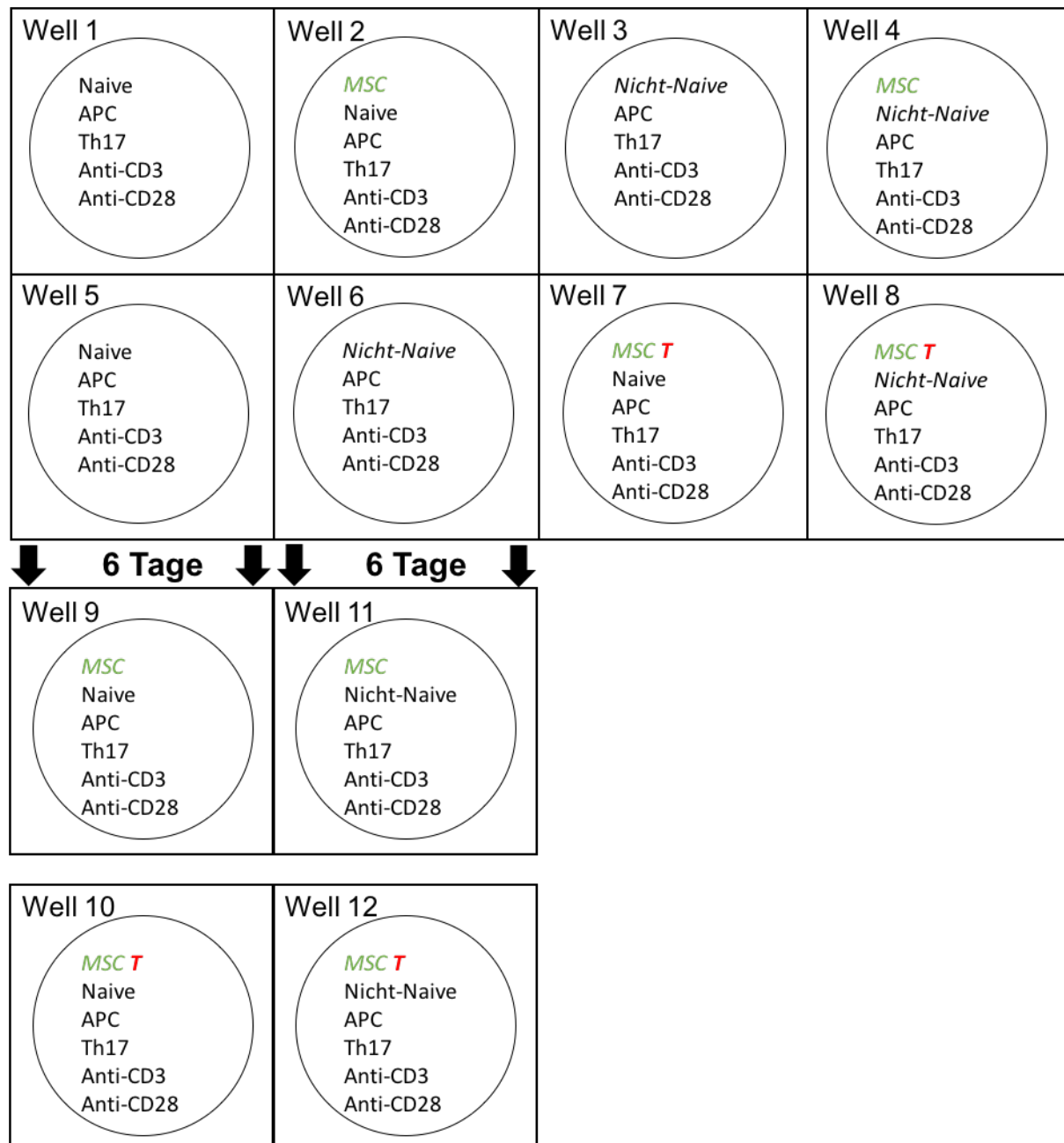


Abbildung 16

Gezeigt sind 12 unterschiedlich konfigurierte Wells. Well 2 enthält Naive CD4⁺ T-Zellen (Naive) und MSCs. Well 1 ist das korrespondierende Kontrollwell von Well 2. Well 4 enthält Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen (Nicht-Naive) und MSCs. Das korrespondierende Kontrollwell von Well 4 ist Well 3. In Well 7 und 8 wird die Co-Kultur (Well 2 und Well 4) durch ein Transwell®-System (T) ersetzt. Well 5 entspricht Well 1 und Well 6 entspricht Well 3. Well 5 und Well 6 enthalten doppelte Zellzahlen. Nach 6 Tagen Inkubationszeit aufteilen von Well 5 und erneute Inkubation für 6 Tage mit MSCs in einem Co-Kultur- (Well 9) und einem Transwell®-System (Well 10). Mit Well 6 wurde analog verfahren. Alle Wells enthalten antigenpräsentierende Zellen (APCs). Zellratio Naive bzw. Nicht-Naive/MSC: 10:1; Zellzahl Naive und Nicht-Naive $2,5 \times 10^5$; Zellzahl APCs: $5,0 \times 10^4$. Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper; Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Etablierungsversuch 11 und 12: Naive- und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen nach 6 Tagen Stimulation

In diesem Teil der Etablierungsversuche wurden Naive und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen mit Beginn der Inkubationszeit in einer Co-Kultur und einem Transwell®-System mit MSCs kultiviert und mittels Th17-Cocktail und Anti-CD3-/Anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Als Kontrollwells ohne MSCs dienten Well 1 und 3 in Abbildung 16.

Naive CD4⁺ T-Zellen

Die Veränderung des Phänotyps Naiver CD4⁺ T-Zellen unter MSC-Einfluss nach 6 Tagen Inkubationszeit verhielt sich analog zu den Etablierungsversuchen 6-10. Im Gegensatz zu den Kontrollwells, bewirkten MSCs eine Beibehaltung des Naiven Phänotyps (CD45RA⁺CD27⁺), bei geringerem Anteil CD45RA⁻CD27⁺ Gedächtnis-Zellen, CD45RA⁻CD27⁻ Effektor-Zellen und CD45RA⁺CD27⁻ TEMRA-Zellen. Die Modulation des Phänotyps durch MSCs konnte sowohl in Co-Kultur, als auch in einem Transwell®-System gleichermaßen beobachtet werden (siehe Tabelle 50 im Anhang).

Verglichen mit Kontrollwells verminderten MSCs die Proliferation isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur und in einem Transwell®-System in gleicher Weise (siehe Tabelle 51 im Anhang).

Die Apoptose Naiver CD4⁺ T-Zellen nach 6 Tagen Stimulation wurde lediglich in Etablierungsversuch 12 bestimmt und war im Kontrollwell gegenüber der Co-Kultur mit MSCs und dem Transwell®-System herabgesetzt. Im Transwell®-System war die Anzahl apoptotischer CD4⁺ T-Zellen tendenziell größer, als in Co-Kultur (siehe Tabelle 52 im Anhang).

Ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen war die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch die Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektor-Zellen im Beisein und in Abwesenheit von MSCs verschieden. Die Etablierungsversuche 11 und 12 deuteten jedoch an, dass MSCs die IL-9- und IFN γ -Produktion insgesamt verringern können, wenngleich einzelne Phänotypen unter Einfluss der MSCs vermehrt IL-9- und IFN γ produzierten.

Entgegen der Etablierungsversuche 6-10 zeigte sich die IL-17-Produktion im Beisein von MSCs tendenziell sogar gesteigert. Die Summe der IL-13-Produktion in den vier untersuchten Phänotypen war unter MSC-Einfluss vergleichsweise höher als ohne MSCs (siehe Tabelle 53 und Tabelle 54 im Anhang). Die absolute Produktion von IL-10 war insgesamt gering, aber in Absenz von MSCs tendenziell erhöht.

In Etablierungsversuch 11 und 12 wurde zusätzlich die Chemokinrezeptorexpression Naiver $CD4^+$ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs bestimmt. Während der Anteil $CCR6^+$ $CD4^+$ T-Zellen durch MSCs herabgesetzt werden konnte, ließ sich bezüglich der $CCR5$ -Expression auf $CD4^+$ T-Zellen kein Unterschied zwischen Kontrollwell und Co-Kultur/Transwell®-System erkennen. Der Anteil $CXCR3^+$ $CD4^+$ T-Zellen in Kultur mit MSC war unwesentlich höher als in Kultur ohne MSCs (siehe Tabelle 55 im Anhang)

Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen

Anstelle von Naiven $CD4^+$ T-Zellen wurde die Etablierungsversuche 11 und 12 ebenfalls mit Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen durchgeführt. Nachfolgend soll nur auf die wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden isolierten Zellfraktionen eingegangen werden.

Die Modulation der einzelnen Phänotypen in der Nicht-Naiven $CD4^+$ Zellfraktion verhielt sich in Kultur mit MSCs analog zur Naiven $CD4^+$ Zellfraktion, wenngleich der Anteil der Effektor- und Gedächtnis-Zellen in der Nicht-Naiven Zellfraktion erhöht war (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** im Anhang).

Wie bei Naiven $CD4^+$ T-Zellen, ließ sich auch die Proliferation Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen durch MSC supprimieren (siehe Tabelle 57 im Anhang)

Im Vergleich zur Co-Kultur schien die Apoptoserate Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen in einem Transwell®-System höher zu sein. Im Kontrollwell ohne MSCs war die Apoptoserate niedriger als im Transwell®-System, aber höher als in Co-Kultur (siehe Tabelle 58 im Anhang).

In Hinblick auf die Zytokinproduktion Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen konnten MSCs sowohl in Co-Kultur, als auch im Transwell®-System die $IFN\gamma$ -, IL-17- und IL-9-Produktion insgesamt

supprimieren. Allerdings wurde die Zytokinproduktion in den einzelnen Phänotypen durch MSCs verschieden reguliert. Der Anteil zytokinproduzierender Effektor- und Gedächtnis-Zellen war bei Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen erwartungsgemäß höher, als bei Naiven CD4⁺ T-Zellen (siehe Tabelle 59 im Anhang).

Die IL-13-Produktion zeigte sich unter dem Einfluss der MSCs eher vermindert (siehe Tabelle 60 im Anhang). Analog zur Naiven Fraktion, war der Anteil IL-10 produzierender CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs im Gegensatz zu T-Zellen in Kultur mit MSCs erhöht.

Während die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 in Kultur mit MSC auf CD4⁺ T-Zellen verstärkt exprimiert wurden, konnte bei CCR6 das Gegenteil im Vergleich zum Kontrollwell beobachtet werden. Zwischen Transwell®-System und Co-Kultur ließ sich kaum ein Unterschied in der Chemokinrezeptorexpression feststellen (siehe Tabelle 61 im Anhang).

Etablierungsversuch 11 und 12: Naive- und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen nach 12 Tagen Stimulation

Im letzten Teil der Etablierungsversuche wurden Naive und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Anti-CD3/CD28-Antikörpern und durch einen Th17-Cocktail vorstimuliert und im Anschluss in einer Co-Kultur und einem Transwell®-System mit MSCs nach Restimulation für 6 weitere Tage inkubiert. Die insgesamt 12 Tage stimulierten T-Zellen der Naiven- und Nicht-Naiven Zellfraktion wurden mit T-Zellen aus den Etablierungsversuchen 11 und 12 verglichen, die nur 6 Tage stimuliert und von Beginn an mit MSCs kultiviert wurden.

Naive CD4⁺ T-Zellen

Bei Naiven CD4⁺ T-Zellen, die bereits zu Beginn mit MSCs kultiviert wurden, konnten höhere Anteile des Naiven-Phänotyps bei verminderten Anteilen des TEMRA-, Gedächtnis- und Effektor-Phänotyps im Vergleich zu vorstimulierten Naiven CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden, die erst nach 6 Tagen mit MSCs co-kultiviert wurden. Dieses Resultat ließ sich sowohl in Co-Kultur, als auch im Transwell®-System beobachten (siehe Tabelle Tabelle 62 im Anhang).

Der Anteil proliferierender Naiver CD4⁺ T-Zellen nach 6 Tagen Vorstimulation und anschließender Restimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs war geringer, als bei Naiven

CD4⁺ T-Zellen die gleich zu Beginn mit MSC kultiviert und nur für 6 Tage stimuliert wurden (siehe Tabelle 63 im Anhang).

Die Apoptoserate Naiver CD4⁺ T-Zellen nach 12 Tagen Stimulation war nur unwesentlich niedriger als nach 6 Tagen Stimulation. Zwischen Co-Kultur und Transwell®-System konnte kein nennenswerter Unterschied in der Proliferation und Apoptose festgestellt werden (siehe Tabelle 64 im Anhang).

Die Produktion der Zytokine IFN γ , IL-17, IL-9, IL-13 und IL-10 war bei vorstimulierten, 12 Tage inkubierten Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein von MSCs tendenziell höher, als nach sechstägiger Stimulation im Beisein von MSCs. Ein signifikanter Unterschied zwischen Co-Kultur und Transwell®-System konnte nicht erkannt werden (siehe Tabelle 65 und Tabelle 66 im Anhang).

Die Expression von CCR5, CCR6 und CXCR3 auf bereits vorstimulierten Naiven CD4⁺ T-Zellen war gegenüber nicht vorstimulierten Zellen vergleichsweise erhöht. Die Chemokinrezeptorexpression in Co-Kultur und einem Transwell®-System waren vergleichbar (siehe Tabelle 67 im Anhang).

Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen

Der Phänotyp vorstimulierter Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen zeigt ein ähnliches Bild, wie der Phänotyp vorstimulierter Naiver CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zu nicht vorstimulierten Zellen, war der Anteil an Effektor- und TEMRA-Zellen bei vorstimulierten Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen erhöht, bei verminderten Anteilen des Naiven und Gedächtnis-Phänotyps.

Die Proliferation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen war wie bei Naiven CD4⁺ T-Zellen nach 12 Tagen Inkubationszeit gegenüber 6 Tagen Inkubationszeit in Co-Kultur und im Transwell®-System gleichermaßen verringert. Vorstimulierte Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen zeigten nach 12 Tagen Inkubationszeit eher eine erhöhte Apoptoserate gegenüber Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen, die für 6 Tage inkubiert wurden. Sowohl nach 6, als auch nach 12 Tagen Inkubationszeit, war die Apoptose im Transwell®-System vergleichsweise höher als in Co-Kultur.

Der Unterschied zwischen sechstägiger und zwölftägiger Inkubationszeit in der Zytokinproduktion Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen verhielt sich analog zu Naiven $CD4^+$ T-Zellen (siehe Tabelle 71 und Tabelle 72 im Anhang).

Während CCR6 im Vergleich zu 12 Tagen Inkubationszeit, nach 6 Tagen Inkubationszeit vermehrt auf Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen exprimiert wurde, war die Expression von CCR5 und CXCR3 nach 6 Tagen vermindert. Die CCR5- und CXCR3-Expression war im Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit gegenüber der Co-Kultur gesteigert (siehe Tabelle 73 im Anhang).

4.1.4. Zusammenfassung der Etablierungsversuche

Die Etablierungsversuche deuten an, dass Naive $CD4^+$ T-Zellen in vitro neben der Co-Stimulation durch Anti-CD3/CD28-Antikörper die Anwesenheit von APCs benötigen, um ausreichend proliferieren zu können.

In sind die 2. und 3. Etablierungsversuchsreihe in einer Übersicht zusammengefasst. Da es in der 1. Etablierungsversuchsreihe ohne APCs zu keiner suffizienten Proliferation in den Kontrollwells kam, sondern erst ab dem 5. Etablierungsversuch, ist die 1. Etablierungsversuchsreihe nicht weiter in aufgeführt.

In Hinblick auf den Phänotyp bewirkten MSC bei Naiven und Nicht-Naiven T-Zellen eine Verminderung der T-Zell-Differenzierung in Richtung $CD45RA^+ CD27^-$ TEMRA-Zellen mit einem erhöhten prozentualen Anteil an $CD45RA^+ CD27^+$ Naiven Zellen und verminderten Anteilen an $CD45RA^- CD27^-$ Effektor- und $CD45RA^- CD27^+$ Gedächtniszellen im Vergleich zum Kontrollwell. Der Anteil an $CD45RA^+ CD27^-$ TEMRA-Zellen war im Beisein und in Abwesenheit von MSCs vergleichbar.

In Gegenwart von MSCs, kam es insgesamt zu einer Reduktion der T-Zellproliferation sowohl bei isolierten Naiven, als auch bei Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen.

Die Apoptose in der Naiven und Nicht-Naiven Zellfraktion wurde in den Etablierungsversuchen durch MSCs variabel beeinflusst. Es konnte sowohl eine Verminderung als auch eine Steigerung des Anteils apoptotischer $CD4^+$ T-Zellen beobachtet werden.

In Summe konnte die Bildung der proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-17 und IL-9 durch MSCs in beiden isolierten Zellfraktionen gehemmt werden, auch wenn in Einzelversuchen eine vermehrte Bildung proinflammatorischer Zytokine beobachtet wurde.

Antiinflammatorisch wirkendes IL-13 wurde vermehrt bei bereits vorstimulierten Naiven und Nicht-Naiven T-Zellen gemessen, die nach 6 Tagen Inkubationszeit für weitere 6 Tage mit MSC co-kultiviert wurden. Die Bildung von IL-10 war insgesamt gering und zeigte sich unter Einfluss der MSC eher vermindert.

Eine Reduktion der Expression des Chemokinrezeptors CCR6 in Kultur mit MSCs ließ sich sowohl in der Naiven, als auch in der Nicht-Naiven-Zellfraktion erkennen. Die Expression von CCR5 war mit und ohne MSCs vergleichbar. CXCR3 wurde insgesamt nur gering und uneinheitlich exprimiert.

verdeutlicht weiterhin, dass MSCs auch über lösliche Faktoren mit T-Zellen in Kontakt treten. Somit können MSCs nicht nur über direkten Zell-Zell-Kontakt mit MSCs interagieren, sondern auch durch die Verwendung von Transwells®.

Der Einfluss der MSCs auf bereits 6 Tage vorstimulierte Naive und Nicht-Naive T-Zellen die anschließend mit MSCs für 6 weitere Tage kultiviert wurden, war ebenfalls vorhanden, allerdings weniger stark ausgeprägt als bei T-Zellen, die direkt zu Beginn mit MSCs kultiviert und stimuliert wurden.

Anhand der Etablierungsversuche ließ sich eine MSC/T-Zell-Ratio von 1:10 und eine Zellzahl von $2,5 \times 10^4$ für MSCs und $2,5 \times 10^5$ für Naive und Nicht-Naive T-Zellen festlegen.

Durch die bereits erwähnte Stimulation und Polarisierung mittels eines Th17-Cocktails und Anti-CD3-/Anti-CD28-Antikörpern, proliferierten die isolierten Naiven und Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen durch die Hinzugabe von $5,0 \times 10^4$ APCs suffizient in einer 24-Well-Platte mit Transwell®-System. Am Boden der 24-Well-Platte bildeten die MSCs eine plastikadhärente Zellschicht. Eine Inkubationszeit von 6 Tagen und die Stimulation zum Zeitpunkt des Ansetzens der Zellkultur, ermöglichten eine ausreichend hohe Zytokinproduktion bei einer akzeptablen Anzahl vitaler Zellen.

Tabelle 22: Übersicht Etablierungsversuche

2. Etablierungsversuchsreihe: Naive mit APCs					3. Etablierungsversuchsreihe: Naive mit APCs					3. Etablierungsversuchsreihe: Nicht-Naive mit APCs				
Versuch 5		Versuch 6 - Versuch 10			Versuch 11 und 12/ 6d und 12d					Versuch 11 und 12/ 6d und 12d				
MSC-	MSC+	MSC-	MSC+	MSC-/MSC-	MSC+ 6d	MSC- 6d	MSC+/MSC-	MSC+ 12d	MSC- 12d	MSC+ 6d	MSC- 6d	MSC+/MSC-	MSC+ 12d	MSC- 12d
Phänotyp Naive	-	++++	++++	↑	++++ (+++++)	+++	↑	+++ (+++)	↑	+++ (++)	+	↑	+++ (++)	↑
Gedächtnis	-	++++	++++	↔	++++ (+++++)	++++	↓	++++ (+++++)	↓	++++ (+++++)	++++	↓	++++ (+++++)	↓
Effektor	-	++	+++	↓	++ (++)	+++	↓	++ (++)	↓	+++ (++)	+++	↓	+++ (+++)	↓
TEMRA	-	+	+	↔	+	+	↔	+	+	+	+	↔	+	+
Proliferation	+++	++	++++	↓	++ (++)	++++	↓	++ (++)	↓	++ (++)	++++	↓	++ (++)	↓
Apoptose	-	+	+	↔	+	+	↔	+	+	+	+	↑	+	+
IFN γ	-	+	++++	↓	+	++	↓	++ (++)	↓	++ (++)	+++	↓	++ (++)	↓
IL-17	-	+	+++	↓	+	+	↔	++ (++)	↔	++ (++)	+++	↓	++ (++)	↓
IL-9	-	-	-	-	+	++	↓	++ (++)	↓	++ (++)	+++	↓	++ (++)	↓
IL-13	-	-	-	-	+	+	↓	++ (++)	↓	++ (++)	++	↓	++ (++)	↓
IL-10	-	0	+	↓	0 (0)	+	↓	+	↓	0 (0)	+	↓	0 (0)	↓
CCR5	-	-	-	-	+	+	↔	+	↔	+	+	↔	+	↔
CCR6	-	-	-	-	+	++	↓	+	↓	+	++	↓	+	↓
CXC3	-	-	-	-	+	0	↑	+	↑	+	+	↔	+	↔

Tabelle 22 gibt die 2. und 3. Etablierungsversuchsreihe im Überblick wieder. Die durchschnittlichen prozentualen Anteile CD4⁺ T-Zellen, die für einen der Parameter Phänotyp, Proliferation, Apoptose, Zytokine und Chemokine positiv sind, werden durch eine unterschiedliche Anzahl des Symbols + verdeutlicht. Je größer der prozentuale Anteil, desto größer die Anzahl an +. MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs; MSC+/MSC- gibt an, wie sich CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs gegenüber CD4⁺ T-Zellen mit MSCs in den verschiedenen Parametern verhalten. ↑ = steigt; ↓ = fällt; ↔ = bleibt gleich; Die runden Klammern zeigen an, dass Transwells® verwendet wurden. 6d = 6 Tage Inkubationszeit; 12d = 6 Tage Vorstimulation Naiver-/Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen und anschließend Co-Kultur bzw. Transwell® mit MSCs für weitere 6 Tage. - = keine Messwerte. 0 = prozentualer Anteil CD4⁺ T-Zellen für einen Parameter liegt bei < 0,5%.

4.2. Charakteristik Patienten, gesunde Probanden und MSC-Spender

4.2.1. Patienten

Die vier exemplarisch ausgewählten und in gezeigten Patienten wiesen ein durchschnittliches Alter von 37,2 Jahren auf. Drei der vier Probanden waren weiblichen, ein Proband männlichen Geschlechts. Bei zwei Patienten konnte anhand der ACR / EULAR Kriterien von 2010 die Diagnose einer erosiven, seropositiven RA gestellt werden [53]. Eine Patientin litt gemäß ACR Diagnosekriterien [109, 110] an SLE, ein Patient an AS [91]. Die Erstdiagnose aller Patienten lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Schnitt 11,5 Jahre zurück. Da ein DAS < 2,6 für die RA-Patienten als Remission definiert wurde [177], zeigten sowohl Patient 1 mit einem DAS28 von 3,50 als auch Patient 2 mit einem DAS28 von 3,35 aktive Krankheitsverläufe. Bei 12 Punkten im SLEDAI konnte bei Patient 3 nicht von Remission ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu deuteten ein BASDAI von 2,3 und ein BASMI von 2 auf einen inaktiven Krankheitsverlauf des Patienten mit AS hin. Die Mittelwerte der Entzündungsparameter betrugen für BSG 23mm nach einer Stunde, für CRP 0,15 mg/dl und für Leukozyten $9,0 \cdot 1000/\mu\text{l}$. Die Medikation der einzelnen Probanden einschließlich Dosierung zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme kann entnommen werden. Die Zellzahlen der extrahierten PBMCs betrugen durchschnittlich $37,4 \times 10^6$ Zellen/30ml Vollblutprobe.

Tabelle 23: Eigenschaften der Patienten

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Alter (J)	60,8	34,4	23,7	29,8
Geschlecht (m/w)	w	w	w	m
Diagnose	Seropositive RA	Seropositive RA	SLE	AS
Jahre seit Erstdiagnose (ED)	31	15	5	7
DAS28	3,50	3,35	-	-
BASDAI	-	-	-	2,3
BASMI	-	-	-	2
SLEDAI	-	-	12	-
BSG (1h)	30mm	4mm	54mm	4mm
CRP (mg/dl)	0,25	0,01	0,04	0,31
Leukozyten (n*1000/ μ l)	9,9	6,7	6,4	12,8
Medikation	MTX: 10mg p.o. 1x/Woche LEF: 20mg 1-0-0 PRE: 40mg 1-0-0	ETA: 50mg s.c. 1x/Woche PRE: 7,5mg 1-0-0	MYC: 500mg 2-0-2 PRE: 40mg 1-0-0	INF: 400mg i.v. 1x/8 Wochen
PBMCs (n*10 ⁶)/30ml Probe	47,6	32,0	30,0	40,0
Remission (ja/nein)	nein	nein	nein	ja

Die Tabelle zeigt Alter in Jahren (J); Geschlecht, männlich/weiblich (m/w); Diagnose (RA = Rheumatoide Arthritis, SLE = Systemischer Lupus erythematoses, AS = Ankylosierende Spondylitis); Jahre seit Erstdiagnose (ED) = Vergangene Zeit in Jahren seit Erstdiagnose ; Disease Activity Score 28 (DAS28); Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI); Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI); Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI); Blutkörperchen senkungsgeschwindigkeit (BSG) nach einer Stunde (1h); C-reaktives Protein (CRP) in mg/dl; Leukozyten in n*1000/ μ l; Medikation zum Zeitpunkt der Blutentnahme (MTX = Methotrexat, LEF = Leflunomid, PRE = Prednisolon, ETA = Etanercept, MYC = Mycophenolatmofetil; INF = Infliximab); Zellzahl PBMCs in der gesammelten Vollblutprobe in n*10⁶; Remission ja/nein (Patient in Remissionsphase ja oder nein). Für Patient 1 und 2 wurde ein DAS28 < 2,6 als Remission definiert [177]. Patient 3 zeigte entsprechend einer Summe von 12 Punkten im SLEDAI eine erhöhte Krankheitsaktivität. Bei Patient 4 konnte anhand niedriger Zahlenwerte im BASDAI und BASMI von einer Remission der Grunderkrankung ausgegangen werden.

4.2.2. Gesunde Kontrollprobanden

Zum direkten Vergleich der Patienten wurden PBMCs von drei weiblichen und einem männlichen gesunden Kontrollprobanden verwendet. Damit unterschied sich die Geschlechterverteilung der Kontrollgruppe mit einem Altersdurchschnitt von 32,2 Jahre nicht von der Geschlechterverteilung der Patientengruppe. Die Zellzahlen der PBMCs lagen im Schnitt bei $43,3 \times 10^6$ Zellen/Vollblutprobe. Alter, Geschlecht und PBMCs der einzelnen Kontrollpersonen können Tabelle 24 entnommen werden.

Tabelle 24: Eigenschaften der gesunden Kontrollprobanden

	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
Alter (J)*	50,9	29,1	24,8	24,1
Geschlecht (m/w)	w	w	M	w
PBMCs ($n \cdot 10^6$)/Probe	67,1	28,2	55,0	23,0

Übersicht gesunde Kontrollprobanden mit den Parametern Alter in Jahren (J); Geschlecht (m = männlich, w = weiblich) und Zellzahl PBMCs in der gesammelten Vollblutprobe in $n \cdot 10^6$.

4.2.3. MSC-Spender

Die beiden männlichen Spender der verwendeten MSCs sind in Tabelle 25 charakterisiert. Zusätzlich zu den Parametern Alter in Jahren, Geschlecht und Diagnose, sind der Entnahmeort, die präoperativen Entzündungswerte und die aktuelle Medikation dargestellt. Alle Experimente wurden mit MSCs in Passage 1 durchgeführt.

Tabelle 25: Charakteristik der MSC-Spender

	MSC 1	MSC 2
Alter (J)	48,9	72,2
Geschlecht (m/w)	m	m
Diagnose	Coxarthrose links	Coxarthrose rechts
Entnahmeort MSC,	Acetabulum links	Acetabulum rechts
CRP (mg/dl)	1,6	0,2
Leukozyten (n*1000/μl)	7,7	6,5
Medikation		Levetiracetam 500mg 1-0-1-0
	Dabigatran 110mg 0-0-2-0	ASS 100mg 0-1-0-0 pausiert
	Pantoprazol 20mg 1-0-0-0	Lorazepam 1mg 0-0-1-0
	Paracetamol 500mg 2-2-2-0	Simvastatin 10mg 0-1-0-0
	Diclofenac 75mg 1-0-1-0	Tromcardin® forte 0-2-0-0
		Perindopril 4mg 0-0-1/2-0

4.3. Modulation des Phänotyps durch MSCs

4.3.1. Modulation des Phänotyps Naiver CD4⁺ T-Zellen

Nach Ablauf der sechstägigen Inkubationszeit unter Th17 Stimulation, sollte zunächst geprüft werden, wie sich der Phänotyp isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von MSCs verändert.

Durch die Oberflächenmarker CD45RA und CD27 ließen sich vier unterschiedliche Phänotypen definieren: TEMRA- (CD45RA⁺CD27⁻), Naive- (CD45RA⁺CD27⁺), Gedächtnis- (CD45RA⁻CD27⁺) und Effektor- (CD45RA⁻CD27⁻) Zellen. Für vier gesunden Kontrollen und vier Patienten wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil der einzelnen Phänotypen an allen CD4⁺ T-

Zellen im Well flowzytometrisch bestimmt. Ergänzend wurde der Phänotyp regulatorischer T-Zellen Tregs (FoxP3⁺CD25⁺CD127⁻) in der Naiven Fraktion bestimmt.

In Tabelle 26 sind die mittleren prozentualen Anteile der T-Zell Subpopulationen der vier gesunden Spender aufgeführt. Im Gegensatz zur Kultur ohne MSCs fällt der signifikant niedrigere prozentuale Anteil an Effektor-Zellen im Well mit MSCs auf (1,8%; SD \pm 1,6% vs. 20,3%; SD \pm 9,7%). Im Vergleich zu TEMRA-Zellen zeigen Gedächtnis- und Naive-Zellen höhere Prozentzahlen in Kultur mit MSCs.

Tabelle 26: Phänotypisierung Naive CD4⁺ T-Zellen von Gesunden mit/ohne MSCs

	Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			
	Mit MSCs			Ohne MSCs			p-Wert
Subpopulationen	Mean \pm SD	Median	Min - Max	Mean \pm SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen in Naiver Fraktion							
TEMRA CD45RA ⁺ CD27 ⁻	0,5 \pm 0,3	0,6	0,2 - 0,8	1,8 \pm 1,3	1,8	0,5 - 3,0	0,114
Naive CD45RA ⁺ CD27 ⁺	32,2 \pm 7,8	30,6	25,8 - 41,9	26,0 \pm 3,8	25,6	21,8 - 31,1	0,114
Gedächtnis CD45RA ⁺ CD27 ⁺	65,5 \pm 6,6	66,6	57,1 - 71,9	52,1 \pm 13,4	51,5	39,3 - 66,0	0,200
Effektor CD45RA ⁻ CD27 ⁻	1,8 \pm 1,6	1,4	0,5 - 4,0	20,3 \pm 9,7	21,8	8,2 - 29,3	0,029
Tregs FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	0,3 \pm 0,2	0,3	0,1 - 0,6	0,5 \pm 0,3	0,5	0,3 - 0,9	0,200

Änderung des Phänotyps isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen gesunder Probanden (HD) im Beisein/in Abwesenheit von MSCs, nach sechstägiger Th17 Stimulation. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen an allen CD4⁺ T-Zellen.
Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum, Max = Maximum. Signifikante p-Werte sind grau markiert. p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs vs. Median Subpopulationen in % ohne MSCs.

Analog zu Naiven CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender wurden im Anschluss Naive CD4⁺ T-Zellen von Patienten unter den gleichen Bedingungen kultiviert und die Phänotypen nach Th17 Stimulation wiederum, wie in Tabelle 27 gezeigt bestimmt. Die prozentualen Anteile der T-Zellsubpopulationen Naiver CD4⁺ T-Zellen von Patienten verhielten sich bis auf den Gedächtnis Phänotyp analog zu den prozentualen Anteilen der T-Zellsubpopulationen Naiver CD4⁺ T-Zellen von gesunden Kontrollprobanden.

Tabelle 27: Phänotypisierung Naive CD4⁺ T-Zellen von *Patienten* mit/ohne MSCs

Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)				Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)			p-Wert
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Subpopulationen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen % in Naiver Fraktion							
TEMRA	2,0 ± 2,7	0,7	0,4 – 6,0	2,9 ± 4,0	1,2	0,3 - 8,9	0,686
CD45RA ⁺ CD27 ⁻							
Naive	35,8 ± 22,8	25,3	22,8 - 69,9	17,3 ± 6,5	15,0	12,4 - 26,9	0,200
CD45RA ⁺ CD27 ⁺							
Gedächtnis	59,3 ± 27,5	72,4	18,1 - 74,3	60,5 ± 22,6	69,8	27,1 - 75,3	1,000
CD45RA ⁺ CD27 ⁺							
Effektor	2,9 ± 2,2	2,6	0,6 - 5,9	19,3 ± 12,2	14,9	10,5 - 37,1	0,029
CD45RA ⁻ CD27 ⁻							
Tregs	0,4 ± 0,2	0,4	0,1 - 0,5	0,6 ± 0,6	0,4	0,2 - 1,5	0,686
FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻							

Änderung des Phänotyps isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen der Patienten (Pat) im Beisein/in Abwesenheit von MSCs, nach sechstägiger Th17 Stimulation. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen an allen CD4⁺ T-Zellen.

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum, Max = Maximum. Signifikante p-Werte sind grau markiert. p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs vs. Median Subpopulationen in % ohne MSCs.

Signifikant zeigt sich auch hier ein deutlich kleinerer prozentualer Anteil an Effektor-Zellen im Well mit MSCs als im Well ohne MSCs (2,9%; SD ± 2,2% vs. 19,3%; SD ± 12,2%).

Der prozentuale Anteil regulatorischer T-Zellen wurde bei gesunden Spendern und Patienten durch MSCs nicht signifikant beeinflusst. In beiden Probandengruppen war der Anteil an Tregs in Gegenwart der MSCs vermindert.

4.3.2. Modulation des Phänotyps Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen

Zusätzlich wurden die Experimente wie in Kapitel 4.3.1. Modulation des Phänotyps Naiver CD4⁺ T-Zellen beschrieben, auch mit Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen durchgeführt und die prozentualen Anteile der bereits erwähnten Phänotypen bestimmt.

Tabelle 28 und Tabelle 29 zeigen analog zu Tabelle 26 und Tabelle 27 die Anteile der einzelnen T-Zell Phänotypen in Prozent nach 6 Tagen Th17 Stimulation von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen von Patienten und gesunden Spendern jeweils in An- und Abwesenheit von MSCs.

Tabelle 28: Phänotypisierung Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen von *Gesunden* mit/ohne MSCs

Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)				Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			p-Wert
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Subpopulationen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen							
TEMRA							
CD45RA ⁺ CD27 ⁻	2,0 ± 1,8	1,4	0,6 - 4,6	2,7 ± 1,5	2,8	0,9 - 4,4	0,686
Naive							
CD45RA ⁺ CD27 ⁺	6,5 ± 2,4	6,1	4,2 - 9,6	9,5 ± 7,5	8,3	2,6 - 19,0	1,000
Gedächtnis							
CD45RA ⁺ CD27 ⁺	64,4 ± 29,5	77,4	20,3 - 82,6	35,5 ± 15,9	40,0	12,6 - 49,5	0,200
Effektor							
CD45RA ⁻ CD27 ⁻	27,1 ± 29,3	13,1	11,4 - 71,0	52,9 ± 20,6	46,8	36,4 - 81,6	0,200
Tregs							
FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	0,3 ± 0,2	0,3	0,1 - 0,4	0,6 ± 0,4	0,5	0,3 - 1,2	0,200

Änderung des Phänotyps isolierter Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen gesunder Probanden (HD) im Beisein/in Abwesenheit von MSCs, nach sechstägiger Th17 Stimulation. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen an allen CD4⁺ T-Zellen.

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs vs. Median Subpopulationen in % ohne MSCs.

Sowohl in der Gruppe der gesunden Probanden (siehe Tabelle 28) als auch in der Gruppe der Patienten (siehe Tabelle 29) konnten MSCs, im Vergleich zur Zellkultur ohne MSCs, keinen signifikanten Unterschied bezüglich der verschiedenen Phänotypen bewirken. Tendenziell war der Anteil an Gedächtnis-Zellen in beiden Probandengruppen (Patienten bzw. gesunde

Probanden) im Beisein von Stammzellen größer als ohne Stammzellen während Effektor-Zellen in Kombination mit MSCs einen kleineren Anteil aufwiesen.

Der Anteil regulatorischer T-Zellen schien auch in der Nicht-Naiven Zellfraktion unter Einwirkung von MSCs kleiner zu sein, als in Kultur ohne MSCs. Dieses Ergebnis konnte bei Patienten und gesunden Kontrollen erfasst werden.

Tabelle 29: Phänotypisierung Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSCs

Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)				Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)			p-Wert
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Subpopulationen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen							
TEMRA CD45RA ⁺ CD27 ⁻	4,7 ± 5,2	2,7	1,0 - 12,2	2,5 ± 1,1	2,3	1,5 - 4,0	1,000
Naive CD45RA ⁺ CD27 ⁺	14,3 ± 16,2	8,3	2,5 - 38,2	6,6 ± 4,8	7,1	1,4 - 11,0	0,886
Gedächtnis CD45RA ⁺ CD27 ⁺	49,6 ± 28,9	52,1	16,3 - 77,9	37,1 ± 21,9	43,3	6,8 - 54,9	0,686
Effektor CD45RA ⁻ CD27 ⁻	31,4 ± 30,6	17,5	13,6 - 77,1	53,7 ± 25,4	47,4	32,4 - 87,8	0,200
Tregs FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	0,4 ± 0,5	0,3	0,0 - 1,0	0,9 ± 0,9	0,6	0,1 - 2,2	0,486

Änderung des Phänotyps isolierter Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen der Patienten (Pat) im Beisein/in Abwesenheit von MSCs, nach sechstägiger Th17 Stimulation. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen an allen CD4⁺ T-Zellen.

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs vs. Median Subpopulationen in % ohne MSCs.

4.3.3. Zusammenfassung Phänotypisierung

Abbildung 17 vergleicht die Ergebnisse aus den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 graphisch. Jedes der beiden Diagramme (A = Naive Fraktion, B = Nicht-Naive Fraktion) stellt die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Subpopulationen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, und Nicht-Naive-Zellen mit bzw. ohne MSCs (MSC+/MSC-) für gesunde Probanden und Patienten (HD/Pat) dar.

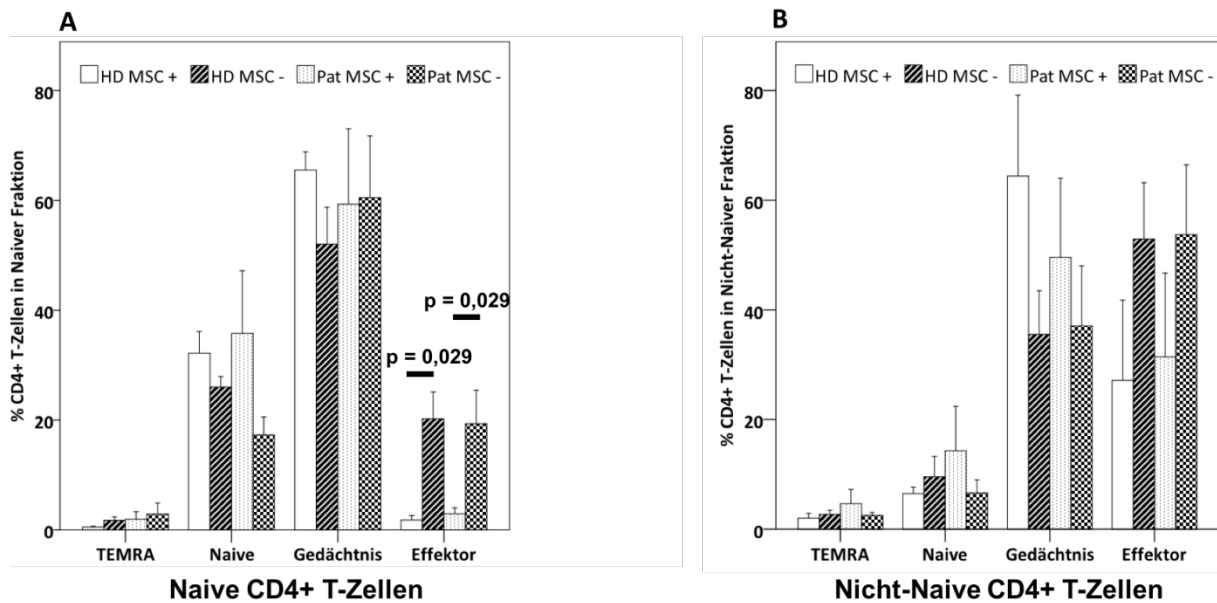


Abbildung 17

Durchschnittlicher prozentualer Anteil CD4⁺ T-Zellen in Naiver (A)/Nicht-Naiver (B) Fraktion ± Standardfehler des Mittelwertes. Veranschaulicht sind die unterschiedlichen Phänotypen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, und Effektor-Zellen) ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen (B) nach 6 Tagen Th17 Stimulation im Beisein/in Abwesenheit (MSC+/MSC-) von MSCs. HD = Gesunde Probanden, Pat = Patienten.

4.4. Proliferation und Apoptose Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen

4.4.1. Proliferation

MSCs hatten nicht nur Einfluss auf den Phänotyp der isolierten T-Zellen, sondern auch auf deren Proliferationsaktivität und Apoptoserate. Während der sechstägigen Inkubationsphase unter proinflammatorischen Bedingungen wurden die Wells täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Zur exakten Quantifizierung der Proliferationsaktivität wurde der Marker Ki 67 verwendet. Damit ließ sich die Proliferation Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen in Kultur mit bzw. ohne MSCs messen. Bereits nach 3 Tagen Inkubationszeit zeigte sich unter dem Lichtmikroskop eine verminderte Proliferation der T-Zellen in Kultur mit MSCs gegenüber T-Zellen, die ohne MSCs kultiviert wurden (siehe Abbildung 18).

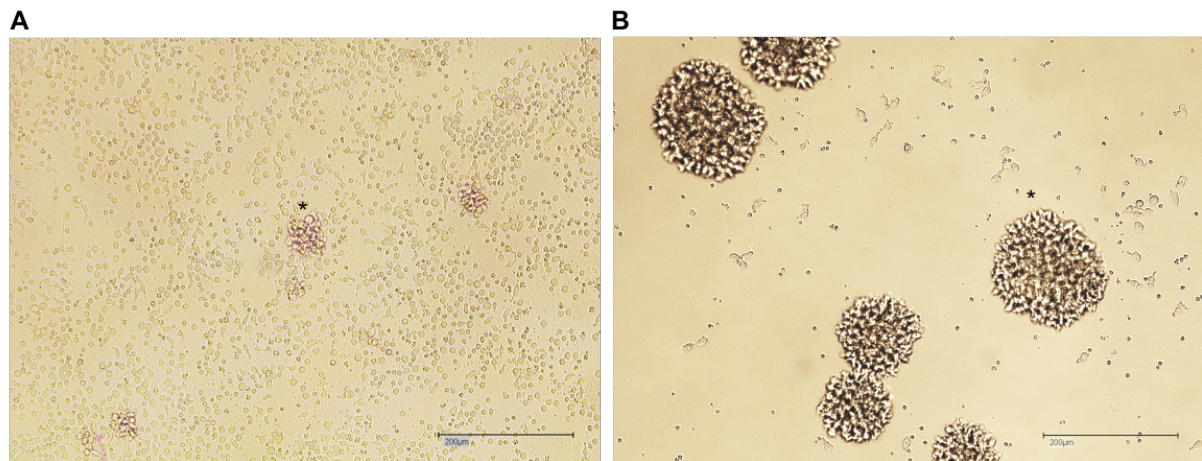


Abbildung 18

Lichtmikroskopische Aufnahme Naiver $CD4^+$ T-Zellen in Kultur *mit* MSCs in (A) und *ohne* MSCs in (B).

* „Proliferationscluster“ als Zeichen erhöhter Proliferationsaktivität. In A wesentlich kleinere Cluster als in B. Vergrößerung 100-fach in A und B.

Signifikante Unterschiede in der Proliferationsaktivität zeigten sich in der Nicht-Naiven Fraktion zwischen gesunden Spendern mit MSCs und ohne MSCs ((79,0%; SD \pm 9,6% vs. 89,6%; SD \pm 2,2%) siehe Tabelle 30). Die flowzytometrische Messung von Ki-67 konnten die Beobachtungen unter dem Mikroskop bestätigen. Tabelle 30 verdeutlicht die verringerte Proliferationsaktivität der Zellen, wenn diese zusammen mit MSCs kultiviert werden.

Der proliferationshemmende Einfluss von MSCs konnte nicht nur bei gesunden Spendern, sondern auch bei Patienten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). Die Proliferation Naiver und Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen wurde durch MSCs in gleicher Weise beeinflusst.

Tabelle 30: Messung der Proliferation durch Ki-67 bei Naiven und Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs

Proliferation Mit MSCs				Proliferation Ohne MSCs			p-Wert
Isolierte Fraktionen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen							
Naive CD4 ⁺ T-Zellen							
HD	72,5 ± 8,1	70,9	64,6 - 83,4	82,4 ± 3,7	82,7	77,6 - 86,6	0,200
Pat	68,6 ± 19,4	72,1	41,9 - 88,3	83,0 ± 5,7	83,8	76,0 - 88,3	0,200
Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen							
HD	79,0 ± 9,6	82,1	65,5 - 86,4	89,6 ± 2,2	89,5	87,1 - 92,2	0,029
Pat	86,7 ± 5,1	87,3	80,0 - 92,0	91,2 ± 2,4	91,7	88,1 - 93,5	0,200

Durchschnittlicher prozentualer Anteil Ki-67⁺ Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen bei Patienten und gesunden Spendern. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum; HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten. Signifikante p-Werte sind grau markiert.
p-Werte: Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs.

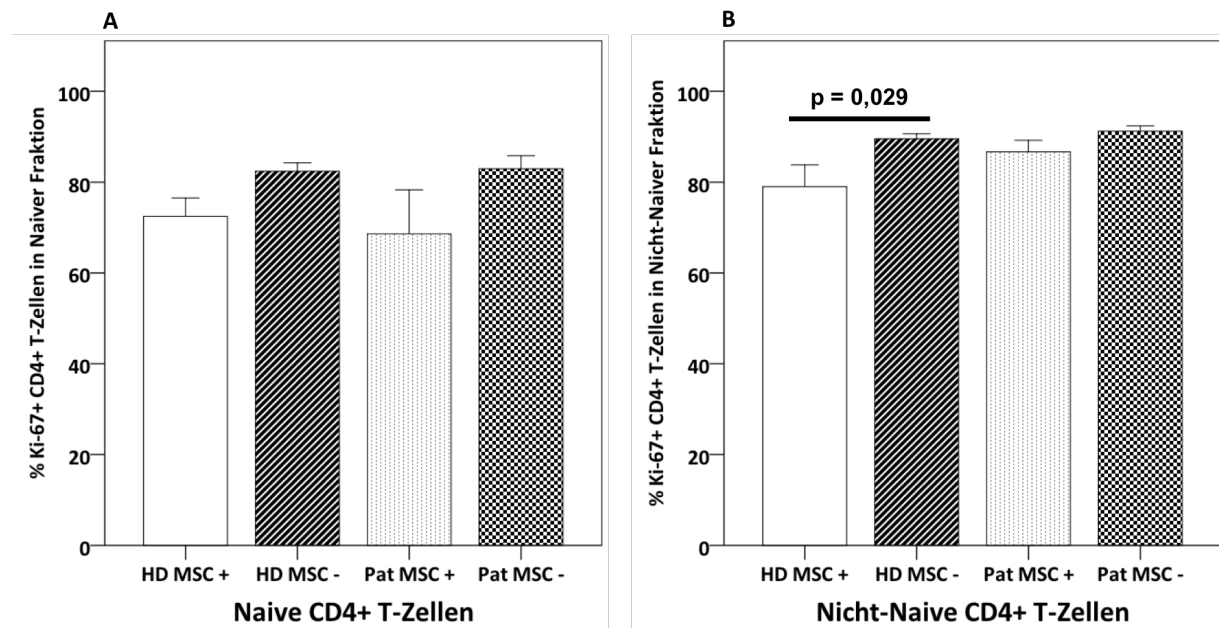


Abbildung 19

Durchschnittlicher prozentualer Anteil Ki-67⁺ Naiver CD4⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (B) bei Patienten und gesunden Spendern \pm Standardfehler des Mittelwertes. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

4.4.2. Apoptose

Durch die in Kapitel 3.2.6.4. Proliferations- und Apoptose-Färbung beschriebene Apoptosefärbung ließen sich Zellen im Frühstadium der Apoptose von Zellen im Spätstadium der Apoptose bzw. bereits nekrotischen Zellen abgrenzen. Gemessen wurde die Apoptoserate Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern und Patienten in Co-Kultur mit MSCs und in Kultur ohne MSCs.

Tabelle 31: Apoptosefrühstadium Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs

Frühstadium Apoptose Mit MSCs				Frühstadium Apoptose Ohne MSCs			p-Wert
Isolierte Fraktionen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen							
Naive CD4 ⁺ T-Zellen							
HD	1,6 ± 0,8	1,5	0,8 - 2,6	2,3 ± 1,6	2,0	0,9 - 4,5	0,486
Pat	1,7 ± 0,9	1,7	0,8 - 2,8	4,2 ± 4,4	2,6	1,2 - 10,6	0,343
Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen							
HD	1,6 ± 0,4	1,8	1,1 - 1,9	2,3 ± 0,5	2,3	1,7 - 2,7	0,114
Pat	2,4 ± 1,5	1,8	1,4 - 4,5	3,2 ± 1,7	3,0	1,4 - 5,2	0,486

Durchschnittlicher prozentualer Anteil Annexin V⁺7AAD⁻ Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen bei Patienten und gesunden Spendern. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum; HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten.

p-Werte: Median Annexin V⁺7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Annexin V⁺7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs.

In Kultur mit Stammzellen schien die Apoptoserate Naiver- und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kultur ohne Stammzellen gesenkt zu werden. Annexin V⁺7AAD⁻ Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Messung im Frühstadium der Apoptose. Die Apoptosehemmung konnte nicht nur bei Zellen gesunder Spender, sondern auch bei Patienten beobachtet

werden (siehe Tabelle 31).

Patienten wiesen tendenziell einen höheren Anteil frühapoptotischer Zellen auf, als gesunde Probanden (siehe Abbildung 20).

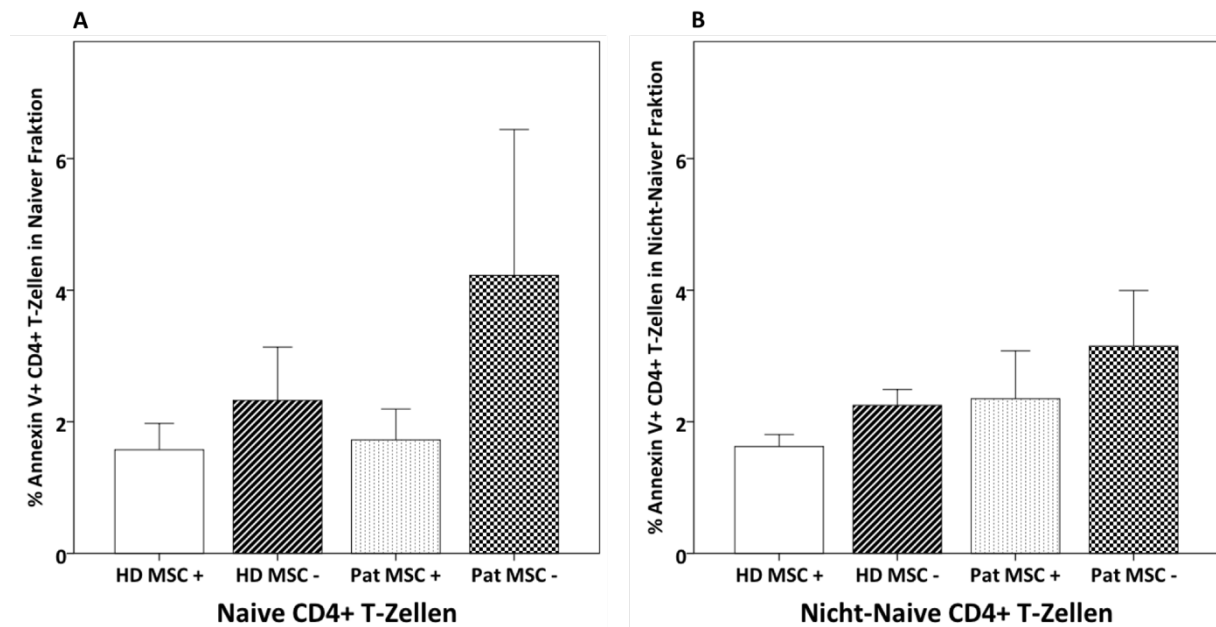


Abbildung 20

Durchschnittlicher prozentualer Anteil Annexin V⁺7AAD⁻ frühapoptotischer Naiver CD4⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (B) bei Patienten und gesunden Spendern \pm Standardfehler des Mittelwertes. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

Annexin V⁺7AAD⁺ Zellen wurden als spätapoptotische oder bereits nekrotische Zellen deklariert. Der Anteil dieser Zellen war im Vergleich zum Anteil frühapoptotischer Zellen geringer. Die hemmende Wirkung der MSCs auf die Apoptoserate konnte zusätzlich bei spätapoptotischen Zellen registriert werden, wenn auch nicht so deutlich wie bei Zellen im Frühstadium der Apoptose. Ein klarer Unterschied in der Apoptoserate zwischen Patienten und gesunden Spendern war im Spätstadium der Apoptose nicht festzustellen.

Tabelle 32: Apoptosespätstadium Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs

Spätstadium Apoptose Mit MSCs				Spätstadium Apoptose Ohne MSCs			p-Wert
Isolierte Fraktionen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen							
Naive CD4 ⁺ T-Zellen							
HD	0,5 ± 0,4	0,3	0,1 - 1,1	0,6 ± 0,6	0,4	0,1 - 1,4	1,000
Pat	0,5 ± 0,3	0,4	0,1 - 0,9	0,6 ± 0,5	0,6	0,1 - 1,2	1,000
Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen							
HD	0,5 ± 0,6	0,2	0,1 - 1,3	0,8 ± 1,2	0,3	0,1 - 2,6	1,000
Pat	0,4 ± 0,5	0,2	0,1 - 1,1	0,7 ± 0,8	0,4	0,2 - 1,8	0,343

Durchschnittlicher prozentualer Anteil Annexin V⁺7AAD⁺ Naiver und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen bei Patienten und gesunden Spendern. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum; HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten.

p-Werte: Median Annexin V⁺7AAD⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Annexin V⁺7AAD⁺ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs.

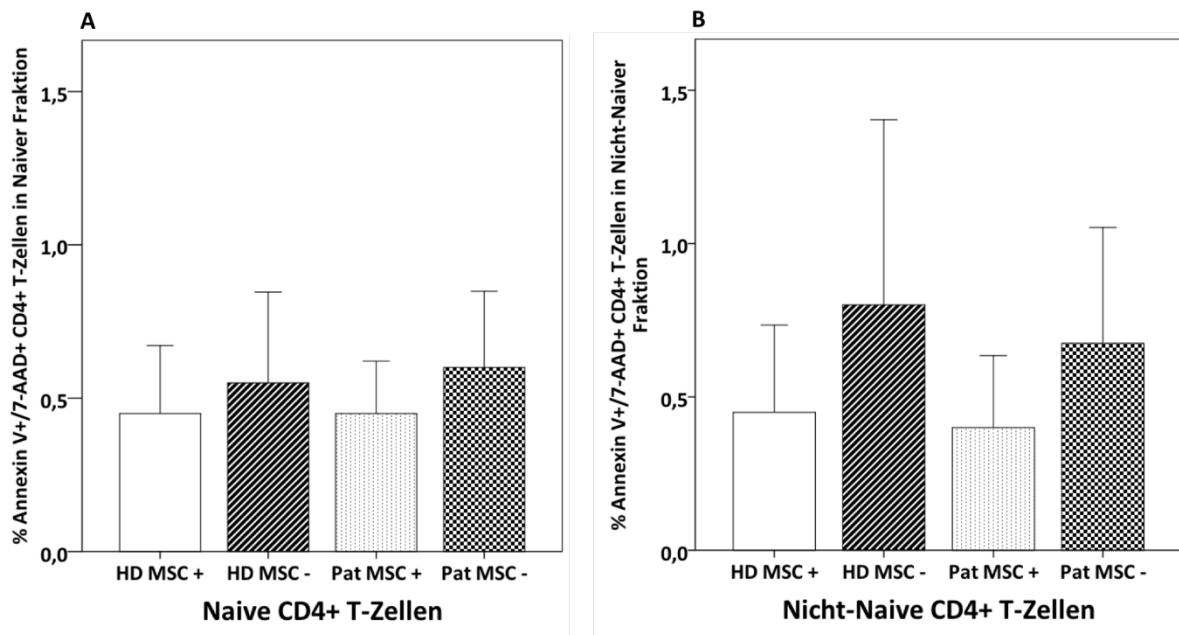


Abbildung 21

Durchschnittlicher prozentuale Anteil spätapoptotischer Annexin V⁺7AAD⁺ Naiver CD4⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (B) bei Patienten und gesunden Spendern \pm Standardfehler des Mittelwertes. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

4.5. Zytokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression

4.5.1. Zytokinproduktion in der Naiven Zellfraktion

1. IFN γ -Produktion Naive Fraktion

Die Anzahl IFN γ produzierender T-Zellen in den einzelnen Subpopulationen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektor-Zellen) konnte in Kultur mit MSCs teilweise signifikant gesenkt werden. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt beim CD45RA⁺CD27⁺ (Naive-Zellen) und CD45RA⁻CD27⁺ (Gedächtnis-Zellen) Phänotyp gesunder Probanden.

Beim Naiven Phänotyp konnte die IFN γ -Produktion von 0,3% (SD \pm 0,1) auf 0,0% (SD \pm 0,1) und beim Gedächtnis Phänotyp von 4,5% (SD \pm 1,6) auf 1,1% (SD \pm 0,9) signifikant gesenkt werden. Ausgehend von isolierten Naiven CD4⁺ T-Zellen produzierten alle vier Phänotypen weniger IFN γ in Kultur mit MSCs als in Absenz von MSCs. Dieser Trend war nicht nur bei Subpopulationen gesunder Probanden, sondern auch bei Patienten zu erkennen (siehe Abbildung 22).

Bei der graphischen Darstellung der FACS-Plots zeigt Abbildung 25 B (MSC-) im rechten unteren

ren Quadranten einen wesentlich größeren prozentualen Anteil IFN γ -produzierender Zellen als in Abbildung 25 D (MSC+).

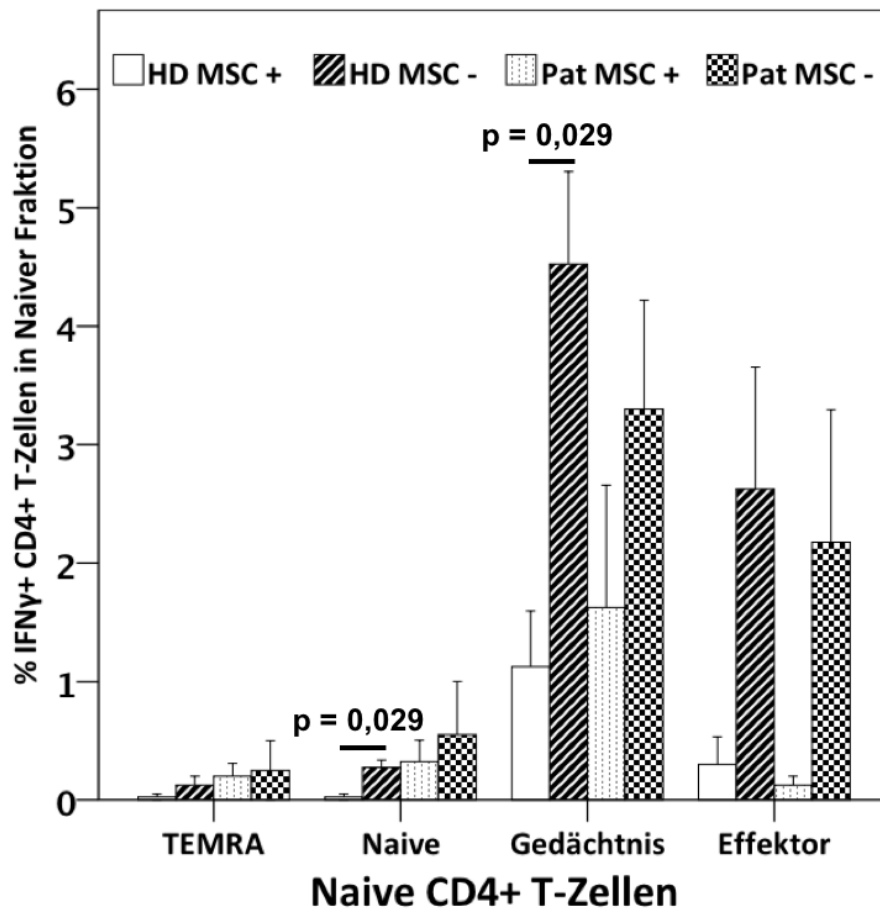


Abbildung 22

Durchschnittliche prozentuale IFN γ -Produktion CD4⁺ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

2. IL-17-Produktion Naive Fraktion

Nach Th17 Stimulation der Zellkultur konnte auch intrazellulär gebildetes IL-17 gemessen werden, das mit verschiedensten Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht wird. In den vier gemessenen Phänotypen wurde die IL-17-Produktion durch MSCs unterschiedlich reguliert. Insgesamt konnte in beiden isolierten Zellfraktionen (Naive und Nicht-Naive Fraktion) eine hemmende Wirkung der MSCs auf die Produktion von IL-17 beobachtet werden. Je nach Phänotyp wurde in Gegenwart von MSCs aber auch mehr IL-17 gebildet, als in Kultur ohne MSCs (siehe Abbildung 23). In der Naiven Zellfraktion befanden sich sowohl mit, als auch ohne Stammzellen nahezu keine IL-17 positiven TEMRA-Zellen.

Naive-Zellen gesunder Spender bildeten weniger IL-17, wenn sie mit MSCs co-kultiviert wurden. Naive-Zellen der Patienten zeigten ein gegensätzliches Bild und bildeten mehr IL-17. In der Naiven Zellfraktion von Patienten supprimierten MSCs die IL-17-Produktion der Gedächtnis-Zellen, während Gedächtnis-Zellen gesunder Probanden in Co-Kultur mit MSCs mehr IL-17 bildeten. CD45RA⁺CD27⁻ Effektor-Zellen trugen wesentlich zur IL-17-Produktion bei. Gleichzeitig war der hemmende Effekt auf die Zytokinproduktion bei diesem Phänotyp am deutlichsten zu erkennen. Der Anteil IL-17 positiver Effektor-Zellen bei Patienten wurde in der Naiven Fraktion durch MSCs signifikant von 0,6% (SD \pm 0,2) auf 0,1% (SD \pm 0,1) verringert (siehe Tabelle 33).

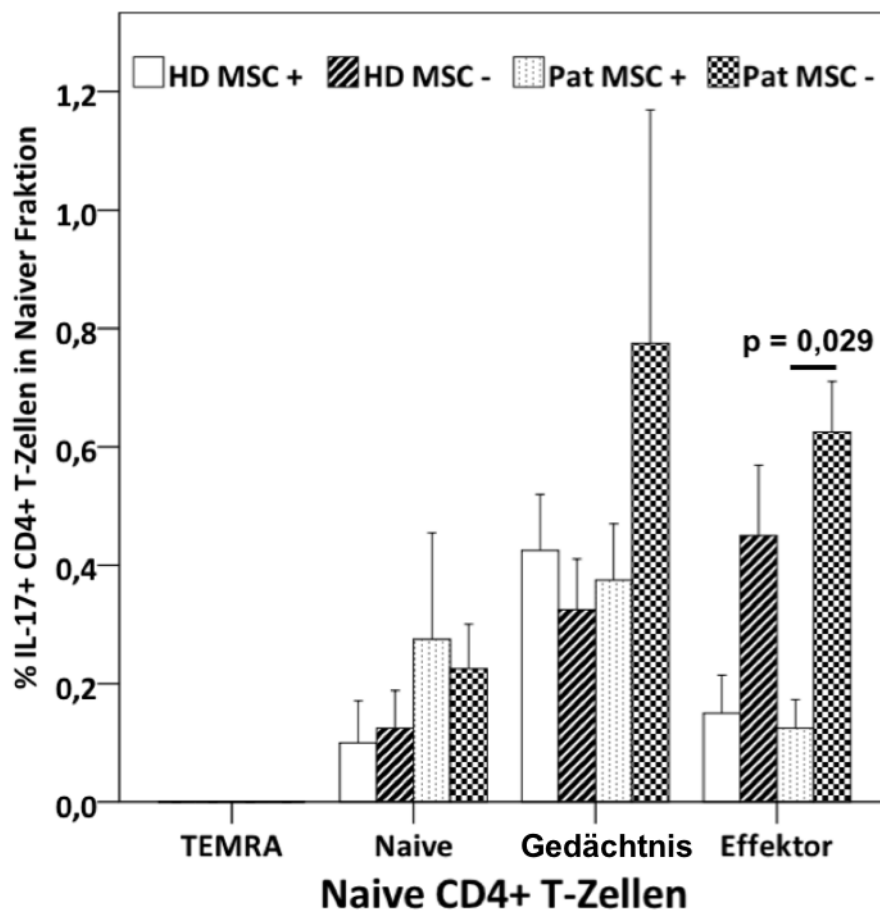


Abbildung 23

Durchschnittliche prozentuale IL-17-Produktion CD4⁺ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

3. IL-9-Produktion Naive Fraktion

IL-9 stellt ein Bindeglied in der Differenzierung zwischen Th17 und Th2 Zellen dar. Wie bei IFN γ und IL-17 konnte auch bei IL-9 der hemmende Einfluss von MSCs auf die Zytokinproduktion nachgewiesen werden. In der Naiven Fraktion gesunder Kontrollen und Patienten regulierten Stammzellen die IL-9-Produktion von TEMRA-, Gedächtnis- und Effektorzellen herunter (siehe Abbildung 24). Während beim Naiven Phänotyp ein gegensätzlicher Effekt der Zytokinproduktion beobachtet werden konnte, fiel die IL-9-Produktion der Effektorzellen von Patienten in Co-Kultur mit MSCs signifikant geringer aus, als im Kontrollwell ohne MSCs (siehe Tabelle 34). Die durch MSCs verringerte IL-9-Produktion in der Naiven Zellfraktion wird durch Abbildung 25 A und C repräsentativ wiedergegeben.

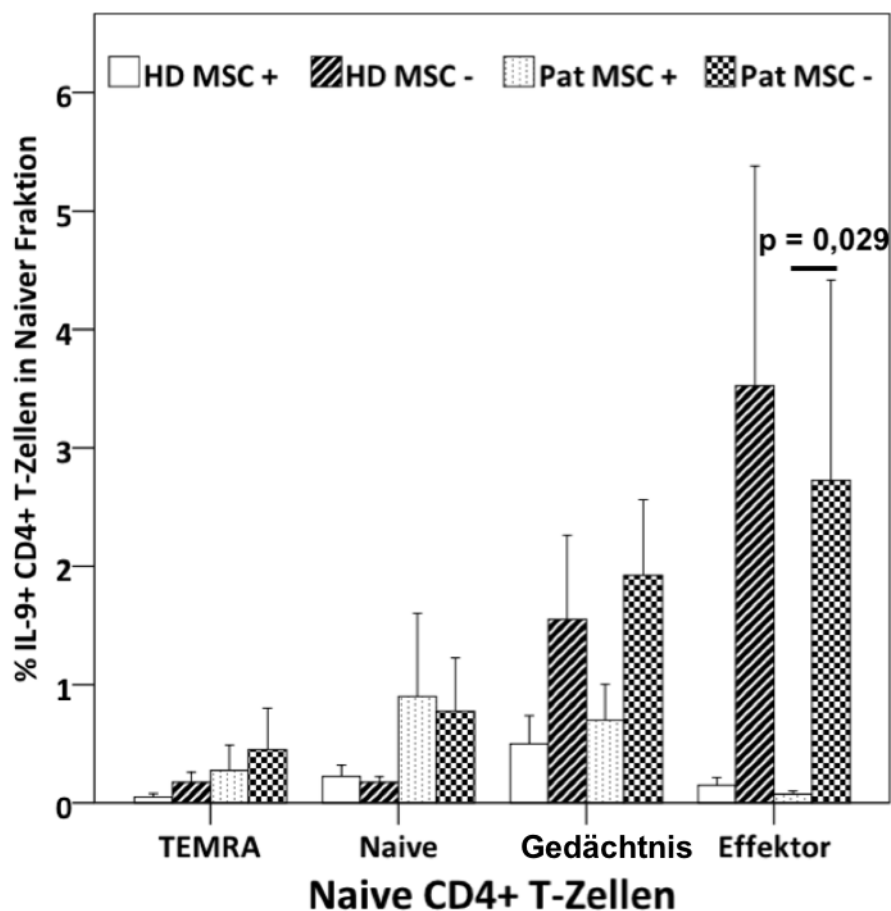
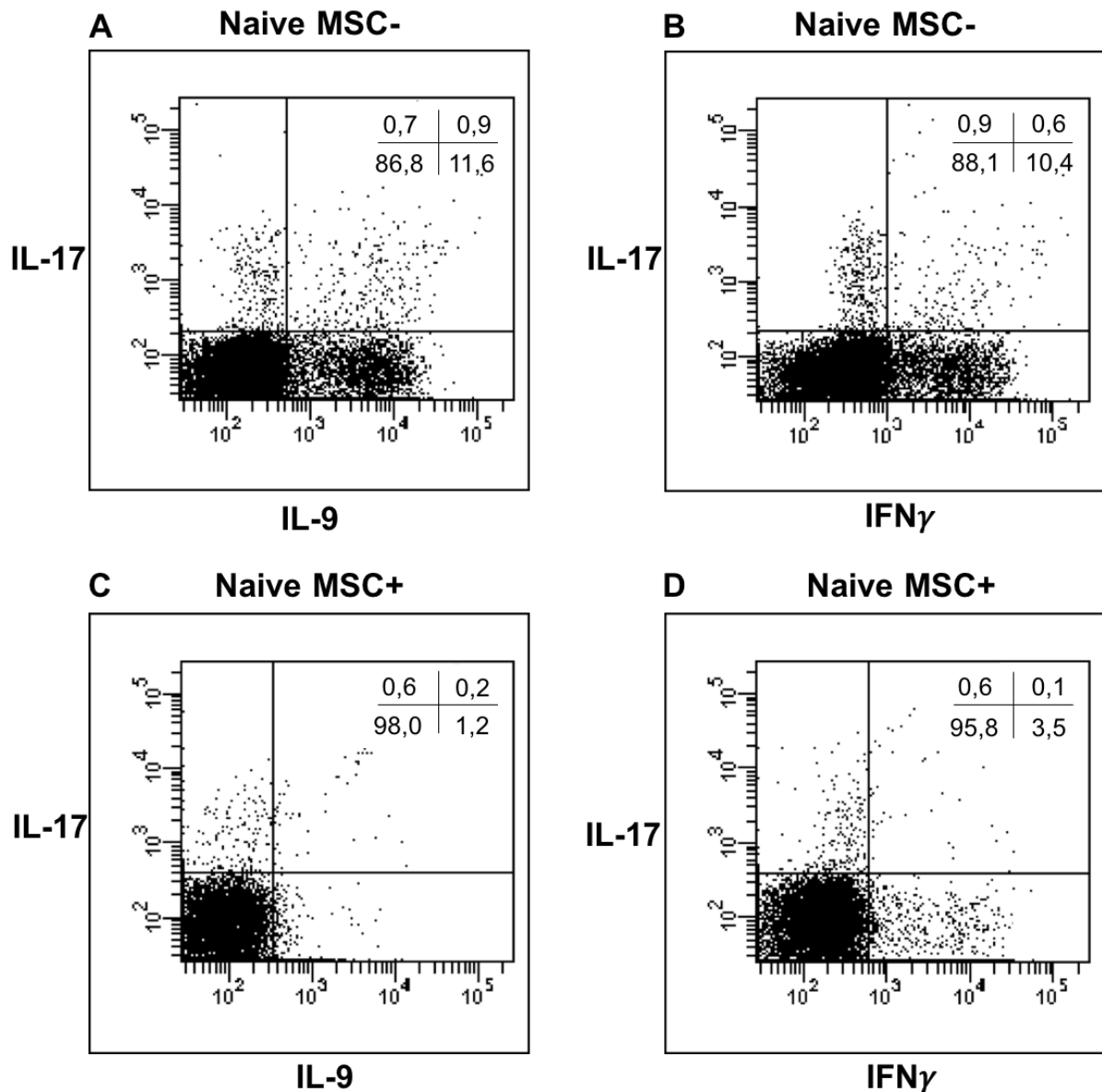


Abbildung 24

Durchschnittliche prozentuale IL-9-Produktion CD4⁺ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

**Abbildung 25**

Repräsentative FACS-Plots für die Zytokinproduktion $CD4^+$ T-Zellen eines Patienten nach Th17 Stimulation. Die Zahlenwerte im rechten oberen Bereich der FACS-Plots geben die prozentuale Anteile der $IL-17^+$, $IL-9^+$, $IL-17^+/IL-9^+$ und $IL-17^-/IL-9^-$ $CD4^+$ T-Zellen in der Naiven Fraktion wieder.

A: IL-17 und IL-9-Produktion Naiver $CD4^+$ T-Zellen ohne MSCs (MSC-)

B: IL-17 und IFN γ -Produktion Naiver $CD4^+$ T-Zellen ohne MSCs (MSC-)

C: IL-17 und IL-9-Produktion Naiver $CD4^+$ T-Zellen mit MSCs (MSC+)

D: IL-17 und IFN γ -Produktion Naiver $CD4^+$ T-Zellen mit MSCs (MSC+)

Tabelle 33: Zytokinproduktion Naiver CD4⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs in gesunden Probanden

Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)				Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			
Mit MSCs				Ohne MSCs			
Zytokinproduktion % CD4 ⁺ T-Zellen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
IFNγ-Produktion							
TEMRA	0,0 ± 0,1	0,0	0,0 - 0,1	0,1 ± 0,2	0,1	0,0 - 0,3	0,486
Naive	0,0 ± 0,1	0,0	0,0 - 0,1	0,3 ± 0,1	0,3	0,1 - 0,4	0,029
Gedächtnis	1,1 ± 0,9	1,3	0,0 - 1,9	4,5 ± 1,6	4,0	3,3 - 6,8	0,029
Effektor	0,3 ± 0,5	0,1	0,0 - 0,1	2,6 ± 2,1	2,3	0,6 - 5,4	0,057
IL-17-Produktion							
TEMRA	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	1,000
Naive	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,3	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,3	0,686
Gedächtnis	0,4 ± 0,2	0,4	0,3 - 0,7	0,3 ± 0,2	0,4	0,1 - 0,7	0,686
Effektor	0,2 ± 0,1	0,2	0,0 - 0,3	0,5 ± 0,2	0,5	0,2 - 0,7	0,114
IL-9-Produktion							
TEMRA	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,1	0,2 ± 0,2	0,2	0,0 - 0,4	0,343
Naive	0,2 ± 0,2	0,2	0,1 - 0,5	0,2 ± 0,1	0,2	0,1 - 0,3	0,886
Gedächtnis	0,5 ± 0,5	0,3	0,2 - 1,2	1,6 ± 1,4	1,1	0,5 - 3,6	0,114
Effektor	0,2 ± 0,1	0,2	0,0 - 0,3	3,5 ± 3,7	2,6	0,1 - 8,8	0,114
IL-13-Produktion							
TEMRA	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,1	0,0 ± 0,1	0,0	0,0 - 0,1	0,343
Naive	0,4 ± 0,3	0,4	0,2 - 0,8	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,029
Gedächtnis	1,2 ± 0,5	1,2	0,7 - 1,9	0,5 ± 0,3	0,4	0,2 - 0,9	0,057
Effektor	0,2 ± 0,2	0,2	0,0 - 0,5	0,4 ± 0,3	0,4	0,1 - 0,7	0,343
IL-10-Produktion							
Tregs	0,1 ± 0,1	0,0	0,0 - 0,2	0,3 ± 0,1	0,3	0,1 - 0,4	0,057

Durchschnittliche prozentuale Zytokinproduktion in den Subpopulationen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen und Tregs) ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen nach Th17 Stimulation über 6 Tage.
 HD = Gesunde Probanden. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum;
 Signifikante p-Werte sind grau markiert.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs.

Tabelle 34: Zytokinproduktion Naiver CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSCs

Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)				Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)			
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Zytokinproduktion % CD4 ⁺ T-Zellen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
IFN γ -Produktion							
TEMRA	0,2 ± 0,2	0,2	0,0 - 0,5	0,3 ± 0,5	0,0	0,0 - 1,0	0,486
Naive	0,3 ± 0,4	0,3	0,0 - 0,8	0,6 ± 0,9	0,2	0,0 - 1,9	1,000
Gedächtnis	1,6 ± 2,1	1,1	0,0 - 4,4	3,3 ± 1,8	3,0	1,4 - 5,8	0,343
Effektor	0,1 ± 0,2	0,1	0,0 - 0,3	2,2 ± 2,2	1,7	0,1 - 5,3	0,114
IL-17-Produktion							
TEMRA	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	1,000
Naive	0,3 ± 0,4	0,2	0,0 - 0,8	0,2 ± 0,2	0,3	0,0 - 0,3	0,686
Gedächtnis	0,4 ± 0,2	0,5	0,1 - 0,5	0,8 ± 0,8	0,6	0,1 - 1,9	0,686
Effektor	0,1 ± 0,1	0,2	0,0 - 0,2	0,6 ± 0,2	0,7	0,4 - 0,8	0,029
IL-9-Produktion							
TEMRA	0,3 ± 0,4	0,1	0,0 - 0,9	0,5 ± 0,7	0,2	0,0 - 1,5	0,686
Naive	0,9 ± 1,4	0,3	0,1 - 3,0	0,8 ± 0,9	0,5	0,1 - 2,0	0,886
Gedächtnis	0,7 ± 0,6	0,5	0,3 - 1,6	1,9 ± 1,3	1,8	0,5 - 3,6	0,057
Effektor	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,1	2,7 ± 3,4	1,6	0,2 - 7,6	0,029
IL-13-Produktion							
TEMRA	0,3 ± 0,4	0,1	0,1 - 0,8	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,686
Naive	0,9 ± 0,8	0,7	0,2 - 1,9	0,2 ± 0,1	0,2	0,1 - 0,2	0,057
Gedächtnis	1,3 ± 0,7	1,0	0,9 - 2,3	0,7 ± 0,5	0,5	0,4 - 1,5	0,200
Effektor	0,2 ± 0,2	0,3	0,0 - 0,4	0,5 ± 0,3	0,4	0,1 - 0,9	0,343
IL-10-Produktion							
Tregs	0,0 ± 0,1	0,0	0,0 - 0,1	0,3 ± 0,5	0,1	0,0 - 1,1	0,200

Durchschnittliche prozentuale Zytokinproduktion in den Subpopulationen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen und Tregs) ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen nach Th17 Stimulation über 6 Tage.

Pat = Patienten. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum; Signifikante p-Werte sind grau markiert.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs.

4. IL-13-Produktion Naive Fraktion

Im Gegensatz zu IFN γ , IL-17 und IL-9 wirkt IL-13 anti-inflammatorisch indem es die Aktivierung von Makrophagen hemmt. Von Interesse war, wie sich die IL-13-Produktion in den einzelnen Phänotypen unter dem Einfluss von MSCs verhält. TEMRA-, Naive- und Gedächtnis-Zellen gesunder Spender und Patienten bildeten in Co-Kultur mit MSCs mehr IL-13 als ohne MSCs. Ein signifikanter Unterschied in der IL-13-Produktion bestand beim Naiven Phänotyp gesunder Spender (MSC+: 0,4%; SD \pm 0,3 vs. MSC-: 0,1%; SD \pm 0,1). Effektor-Zellen von Patienten und gesunden Kontrollen waren unter Einwirkung der MSCs weniger IL-13 positiv als Effektor-Zellen, die ohne Stammzellen inkubiert waren. Der größte Anteil IL-13 positiver T-Zellen war bei Gedächtnis-Zellen zu registrieren (siehe Abbildung 26).

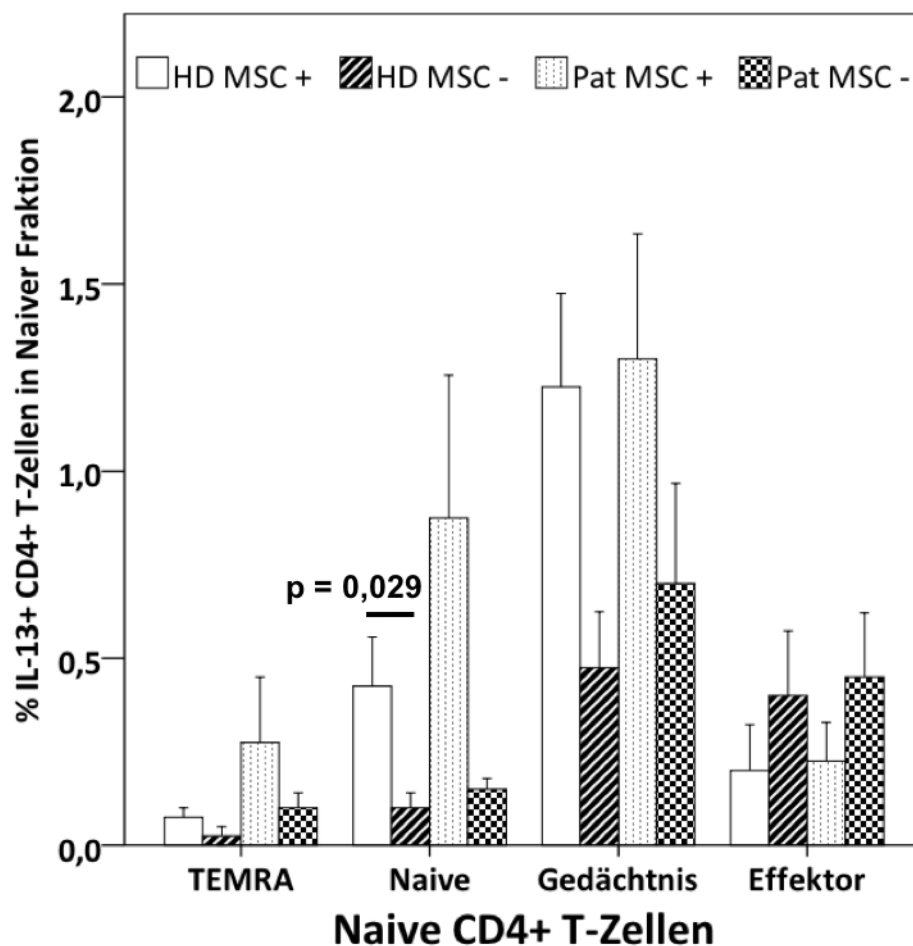


Abbildung 26

Durchschnittliche prozentuale IL-13-Produktion CD4⁺ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

5. IL-10-Produktion Naive Fraktion

Wie IL-13 weist auch IL-10 anti-inflammatorische Eigenschaften auf und begrenzt damit eine Entzündungsreaktion. Ausgehend von der Naiven Zellfraktion produzierten die in Abbildung 27 gezeigten Tregs gesunder Kontrollen und Patienten sowohl mit, als auch ohne MSCs nur geringfügig IL-10. Dabei wirkten sich MSCs sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten hemmend auf die IL-10-Produktion der Tregs aus. (siehe Abbildung 27).

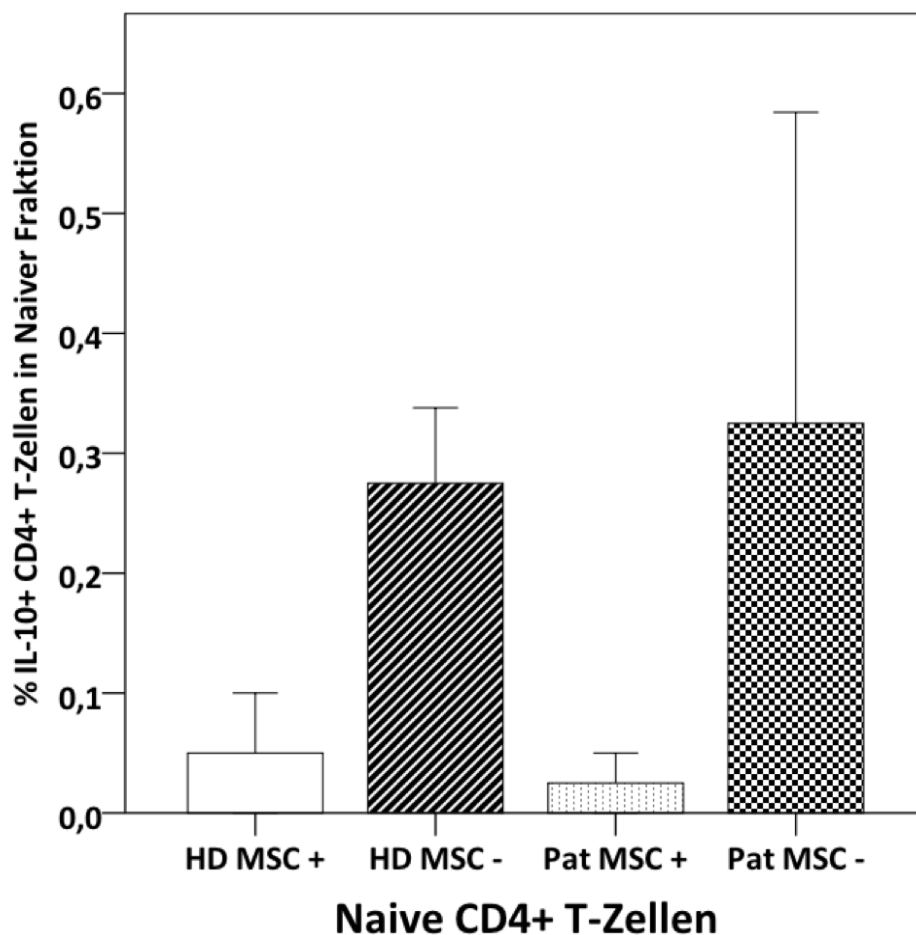


Abbildung 27

Durchschnittliche prozentuale IL-10-Produktion $CD4^+$ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in Tregs bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven $CD4^+$ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

4.5.2. Chemokinrezeptorexpression in der Naiven Zellfraktion

In Tabelle 35 und Tabelle 36 sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der exprimierten Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 sowohl für gesunde Probanden, als auch für Patienten als Summe der einzelnen Phänotypen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektor-Zellen) aufgetragen. Untersucht wurde, welchen Einfluss MSCs auf die Ausprägung dieser Rezeptoren haben. Trotz nicht signifikanter Unterschiede der Chemokinrezeptorexpression in den verschiedenen Probandengruppen schienen CCR6 und CXCR3 in Zellkultur ohne MSCs häufiger exprimiert zu werden (siehe Abbildung 28).

Da sich die CCR5-Expression bei gesunden Kontrollen und Patienten im Beisein als auch in Abwesenheit von MSCs sehr ähnelte und gleichzeitig äußerst gering war, ließ sich kein klarer Trend erkennen.

Tabelle 35: Chemokinrezeptorexpression Naive CD4⁺ T-Zellen gesunder Probanden mit/ohne MSC

	Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Chemokinrezeptoren	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen							
CCR5	0,6 ± 0,6	0,4	0,1 - 1,4	0,7 ± 0,4	0,6	0,4 - 1,2	0,686
CCR6	1,2 ± 0,2	1,1	1,0 - 1,4	1,9 ± 0,9	1,8	1,1 - 2,8	0,200
CXCR3	1,0 ± 0,6	0,7	0,5 - 1,9	1,6 ± 0,4	1,6	1,1 - 2,1	0,200

Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 positiver CD4⁺ T-Zellen, ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

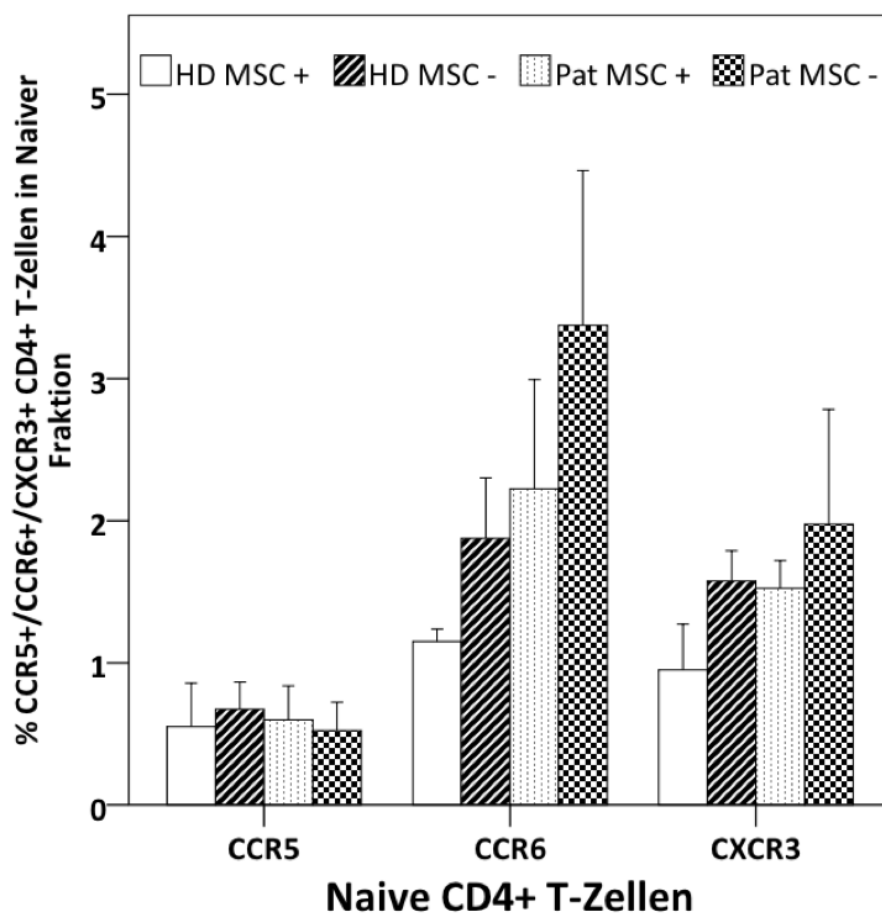
p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % ohne MSCs.

Tabelle 36: Chemokinrezeptorexpression Naive CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSC

Chemokinrezeptoren	Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)			Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)			
	Mit MSCs			Ohne MSCs			p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
CCR5	0,6 ± 0,5	0,6	0,1 - 1,1	0,5 ± 0,4	0,6	0,2 - 1,1	1,000
CCR6	2,2 ± 1,5	1,9	0,8 - 4,4	3,4 ± 2,2	1,9	1,7 - 6,5	0,343
CXCR3	1,5 ± 0,4	1,6	1,1 - 1,9	1,8 ± 1,1	1,6	0,7 - 4,3	0,886

Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 positiver CD4⁺ T-Zellen, ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen. Pat = Patienten. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % ohne MSCs.

**Abbildung 28**

Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 exprimierender CD4⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs, MSC+ = mit MSCs.

4.5.3. Zytokinproduktion in der Nicht-Naiven Zellfraktion

1. IFN γ -Produktion Nicht-Naive Fraktion

Wie in der Naiven Zellfraktion war auch in der Nicht-Naiven-Fraktion ein inhibierender Effekt der MSCs auf die IFN γ -Produktion zu erkennen, dieser beschränkte sich jedoch auf die Phänotypen Gedächtnis- und Effektor-Zellen. TEMRA-, und Naive-Zellen gesunder Kontrollen und Patienten produzierten im Beisein von MSCs geringfügig mehr IFN γ (siehe Abbildung 29). Abbildung 32 B zeigt die IFN γ -Produktion aller Phänotypen der Nicht-Naiven Zellfraktion ohne MSC (MSC-). Im Vergleich dazu wird die in Abbildung 32 D gezeigte geringere IFN γ -Produktion der Zellen in Co-Kultur mit MSCs deutlich.

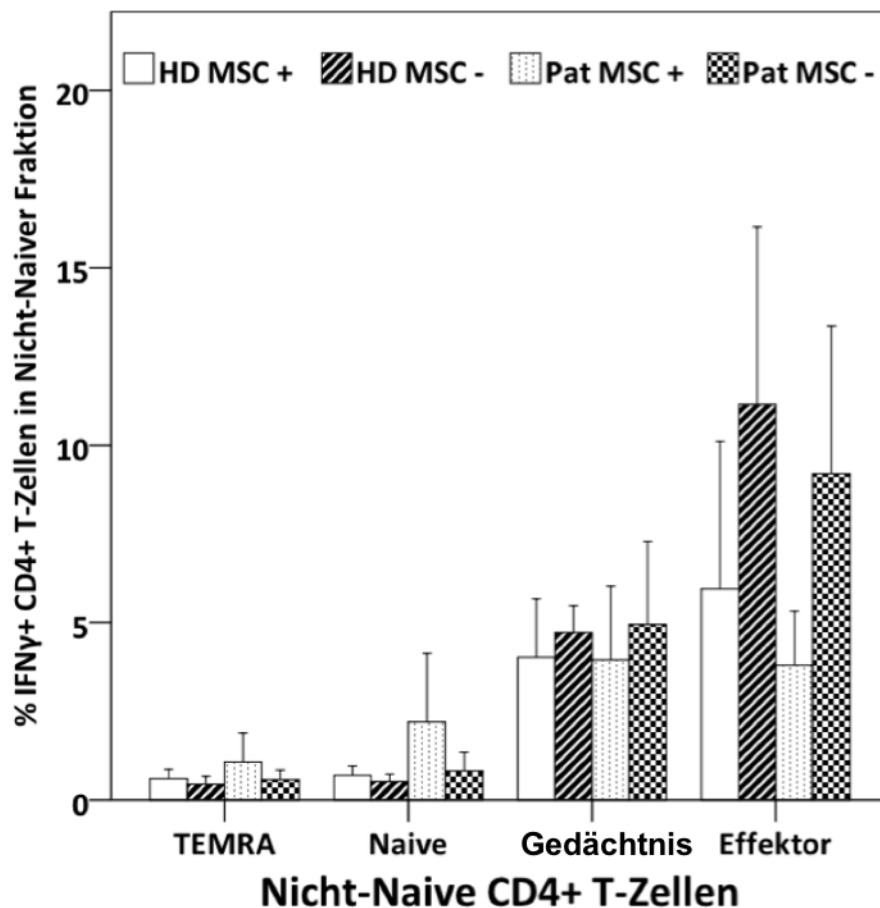


Abbildung 29

Durchschnittliche prozentuale IFN γ -Produktion CD4⁺ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

2. IL-17-Produktion Nicht-Naive Fraktion

Insgesamt hatten MSCs keinen einheitlichen Effekt auf die IL-17-Produktion in den einzelnen Phänotypen der Nicht-Naiven Zellfraktion. Effektor-Zellen bildeten in Gegenwart von MSCs weniger IL-17. Dies konnte sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Spendern beobachtet werden (siehe Abbildung 30). Bei Naiven- und TEMRA-Zellen war der Anteil IL-17 positiver Zellen dagegen größer, wenn sich die Zellen in Co-Kultur mit MSCs befanden, unabhängig davon ob es sich um Patienten oder gesunde Kontrollen handelte. Gedächtnis-Zellen gesunder Spender wiesen in Co-Kultur mit MSCs höhere IL-17 Werte auf. Gedächtnis-Zellen der Patienten bildeten jedoch weniger IL-17 unter Einfluss der Stammzellen.

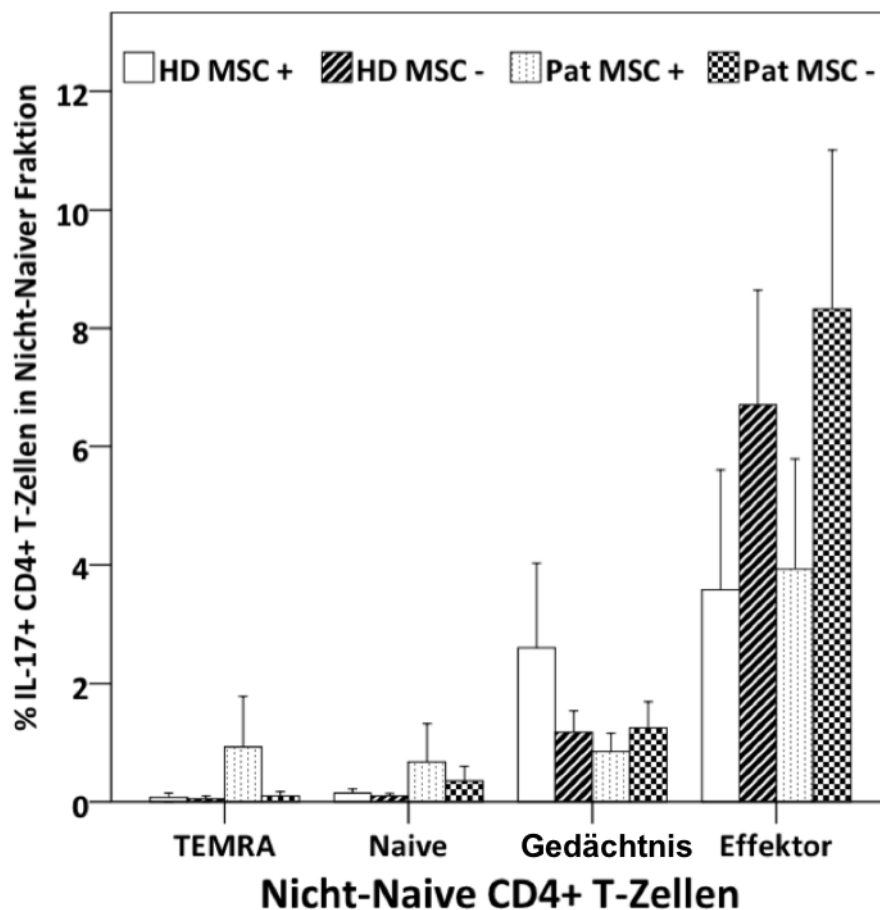


Abbildung 30

Durchschnittliche prozentuale IL-17-Produktion $CD4^+$ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

3. IL-9-Produktion Nicht-Naive Fraktion

Die IL-9-Produktion in den Phänotypen der Nicht-Naiven Fraktion verhielt sich ähnlich wie die IFN γ -Produktion in der Nicht-Naiven Fraktion. Der Anteil IL-9 positiver Effektor- und Gedächtnis-Zellen war ohne MSCs größer als in Kultur mit MSCs. TEMRA- und Naive-Zellen verhielten sich konträr zu Gedächtnis- und Effektor-Zellen. Der größte inhibierende Effekt auf die IL-9-Produktion war bei CD45RA⁻CD27⁻ Effektor-Zellen zu erkennen. Obgleich sich die IL-9-Produktion unter Einfluss der MSCs in den unterschiedlichen Phänotypen nicht homogen verhielt, war die Summe aller IL-9 produzierender Zellen größer, wenn sich die Phänotypen der Nicht-Naiven Fraktion nicht in Co-Kultur mit MSCs befanden (siehe Abbildung 31).

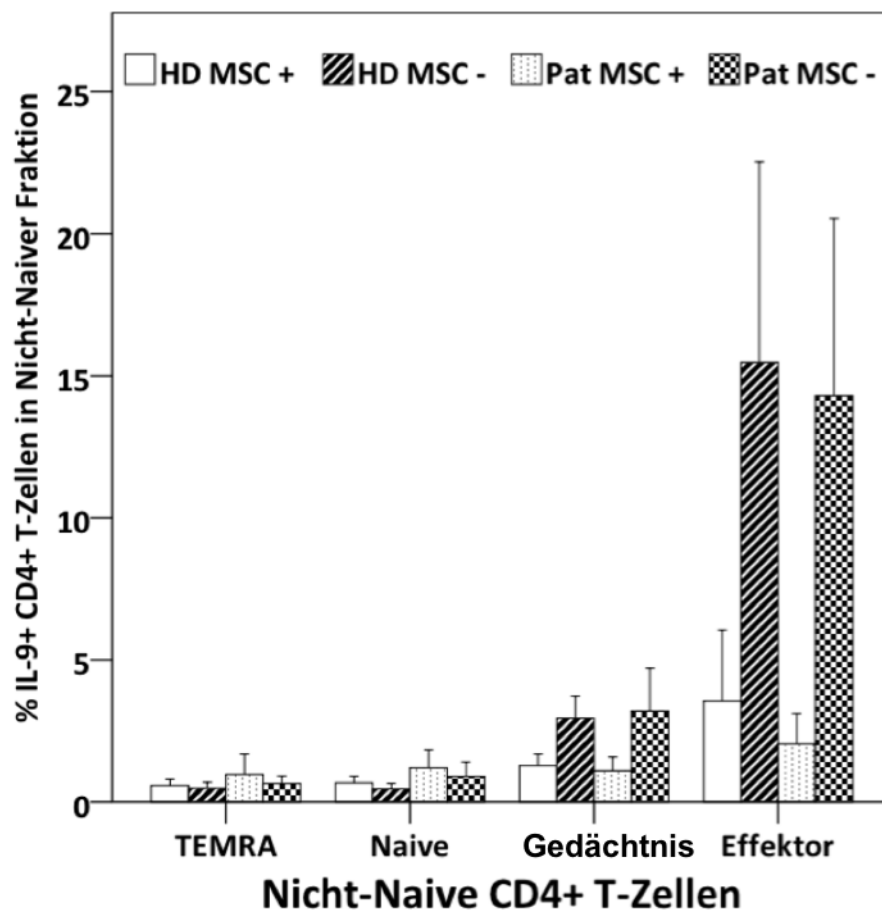
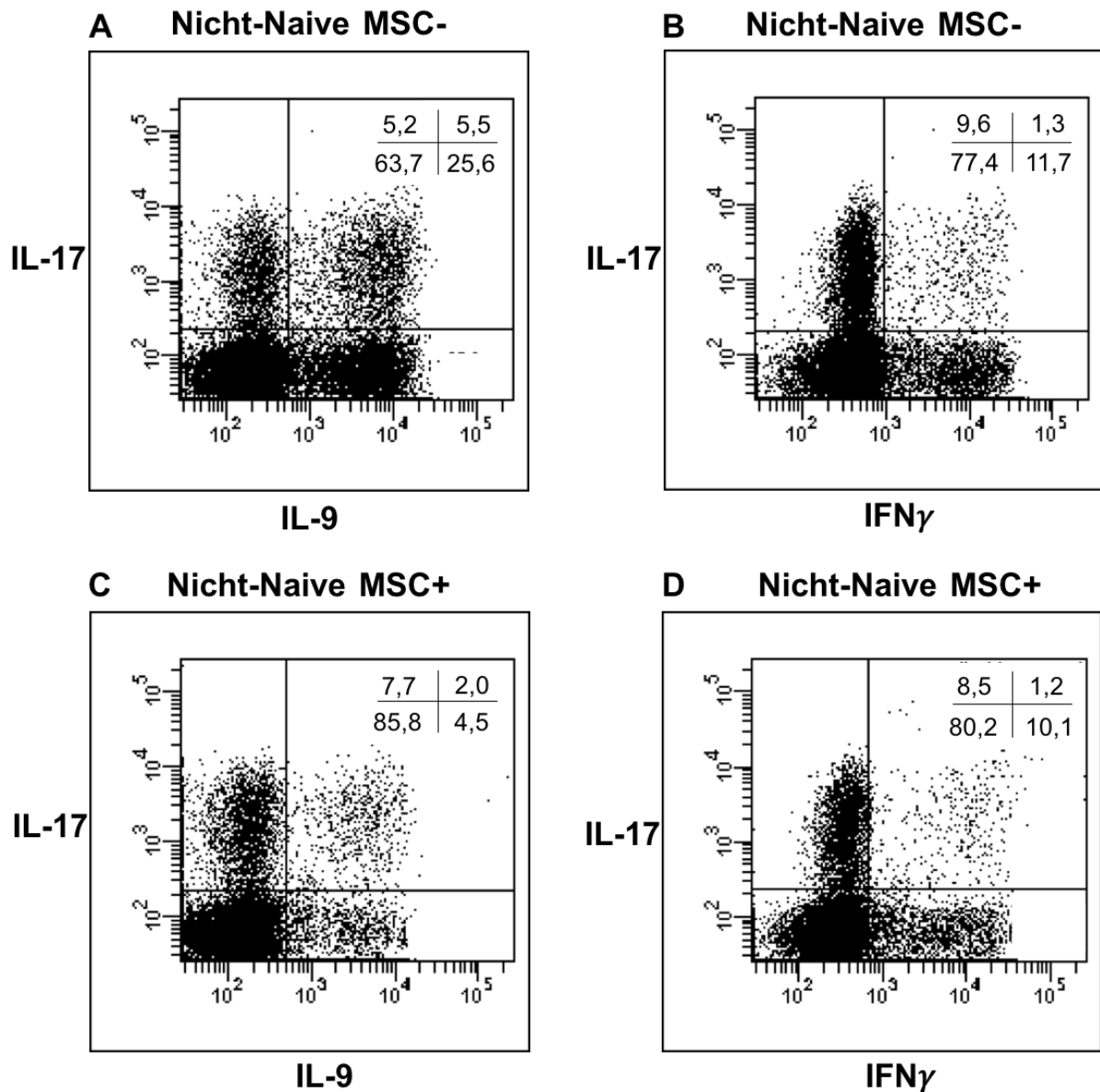


Abbildung 31

Durchschnittliche prozentuale IL-9-Produktion CD4⁺ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

**Abbildung 32**

Repräsentative FACS-Plots für die Zytokinproduktion $CD4^+$ T-Zellen eines Patienten nach Th17 Stimulation. Die Zahlenwerte im rechten oberen Bereich der FACS-Plots geben die prozentuale Anteile der IL-17+, IL-9+, IL-17+/IL-9+ und IL-17-/IL-9- $CD4^+$ T-Zellen in der Nicht-Naiven Fraktion wieder.

A: IL-17 und IL-9-Produktion Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen ohne MSCs (MSC-)

B: IL-17 und IFN γ -Produktion Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen ohne MSCs (MSC-)

C: IL-17 und IL-9-Produktion Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen mit MSCs (MSC+)

D: IL-17 und IFN γ -Produktion Nicht-Naiver $CD4^+$ T-Zellen mit MSCs (MSC+)

Tabelle 37: Zytokinproduktion Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen gesunder Probanden mit/ohne MSCs

	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			p-Wert
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Zytokinproduktion % CD4 ⁺ T-Zellen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
IFN γ -Produktion							
TEMRA	0,6 ± 0,5	0,5	0,1 - 1,3	0,5 ± 0,4	0,3	0,1 - 1,1	0,686
Naive	0,7 ± 0,5	0,7	0,1 - 1,3	0,5 ± 0,4	0,5	0,1 - 1,1	0,686
Gedächtnis	4,0 ± 3,3	4,2	0,1 - 7,7	4,7 ± 1,5	4,3	3,5 - 6,9	1,000
Effektor	6,0 ± 8,3	2,3	0,8 - 18,4	11,2 ± 10,0	6,8	5,0 - 26,1	0,200
IL-17-Produktion							
TEMRA	0,1 ± 0,2	0,0	0,0 - 0,3	0,1 ± 0,1	0,0	0,0 - 0,2	0,886
Naive	0,2 ± 0,1	0,2	0,0 - 0,3	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,686
Gedächtnis	2,6 ± 2,9	1,8	0,3 - 6,6	1,2 ± 0,7	1,0	0,6 - 2,2	0,686
Effektor	3,6 ± 4,1	2,5	0,0 - 9,4	6,7 ± 3,9	7,2	1,9 - 10,5	0,486
IL-9-Produktion							
TEMRA	0,6 ± 0,5	0,6	0,1 - 1,1	0,5 ± 0,4	0,4	0,1 - 1,1	0,886
Naive	0,7 ± 0,5	0,8	0,1 - 1,1	0,5 ± 0,4	0,4	0,1 - 1,0	0,486
Gedächtnis	1,3 ± 0,8	0,9	0,8 - 2,5	3,0 ± 1,6	2,9	1,3 - 4,8	0,114
Effektor	3,6 ± 5,0	1,4	0,4 - 11,0	15,5 ± 14,1	11,1	4,4 - 35,4	0,114
IL-13-Produktion							
TEMRA	0,3 ± 0,2	0,3	0,0 - 0,5	0,3 ± 0,2	0,2	0,1 - 0,6	0,886
Naive	0,4 ± 0,2	0,5	0,1 - 0,6	0,3 ± 0,3	0,2	0,1 - 0,8	0,686
Gedächtnis	2,9 ± 1,8	2,2	1,7 - 5,6	1,0 ± 0,2	1,0	0,7 - 1,3	0,029
Effektor	2,8 ± 3,1	1,7	0,3 - 7,3	3,6 ± 2,3	3,1	1,5 - 6,8	0,686
IL-10-Produktion							
Tregs	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,3	0,7 ± 0,5	0,6	0,3 - 1,4	0,029

Durchschnittliche prozentuale Zytokinproduktion in den Subpopulationen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen und Tregs) ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen nach Th17 Stimulation über 6 Tage. HD = Gesunde Probanden. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum; Signifikante p-Werte sind grau markiert.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs.

Tabelle 38: Zytokinproduktion Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSCs

	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)			Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat)			
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Zytokinproduktion % CD4 ⁺ T-Zellen	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
IFN γ -Produktion							
TEMRA	1,1 ± 1,6	0,4	0,1 - 3,5	0,6 ± 0,6	0,4	0,2 - 1,4	1,000
Naive	2,2 ± 3,9	0,4	0,1 - 8,0	0,8 ± 1,1	0,4	0,2 - 2,4	1,000
Gedächtnis	4,0 ± 4,2	3,0	0,2 - 9,6	5,0 ± 4,7	3,4	1,2 - 11,8	1,000
Effektor	3,8 ± 3,0	3,9	0,2 - 7,3	9,2 ± 8,3	7,1	2,5 - 20,1	0,486
IL-17-Produktion							
TEMRA	0,9 ± 1,7	0,1	0,0 - 3,5	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,3	0,886
Naive	0,7 ± 1,3	0,1	0,0 - 0,1	0,4 ± 0,5	0,1	0,1 - 1,1	0,486
Gedächtnis	0,9 ± 0,6	0,9	0,1 - 1,6	1,3 ± 0,9	1,0	0,5 - 2,5	0,686
Effektor	3,9 ± 3,7	3,4	0,0 - 8,9	8,3 ± 5,4	7,8	2,9 - 14,8	0,200
IL-9-Produktion							
TEMRA	1,0 ± 1,4	0,4	0,1 - 3,1	0,7 ± 0,5	0,5	0,3 - 1,4	1,000
Naive	1,2 ± 1,3	0,9	0,1 - 3,0	0,9 ± 1,0	0,5	0,3 - 2,4	0,686
Gedächtnis	1,1 ± 0,9	0,8	0,4 - 2,5	3,2 ± 3,0	2,1	1,1 - 7,6	0,114
Effektor	2,1 ± 2,1	1,2	0,7 - 5,2	14,3 ± 12,5	12,0	3,6 - 29,6	0,114
IL-13-Produktion							
TEMRA	0,4 ± 0,1	0,4	0,3 - 0,4	0,3 ± 0,3	0,2	0,1 - 0,8	0,343
Naive	0,6 ± 0,4	0,7	0,1 - 0,9	0,2 ± 0,2	0,2	0,0 - 0,4	0,114
Gedächtnis	2,4 ± 2,6	1,2	0,8 - 6,3	0,9 ± 0,4	1,1	0,3 - 1,2	0,343
Effektor	2,3 ± 1,9	2,3	0,2 - 4,3	3,2 ± 1,3	3,4	1,6 - 4,5	0,486
IL-10-Produktion							
Tregs	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,3	0,5 ± 0,4	0,5	0,2 - 1,0	0,114

Durchschnittliche prozentuale Zytokinproduktion in den Subpopulationen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen und Tregs) ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen nach Th17 Stimulation über 6 Tage. Pat = Patienten. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum; Signifikante p-Werte sind grau markiert.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs.

4. IL-13-Produktion Nicht-Naive Fraktion

Bereits bei der Naiven Zellfraktion beschrieben, ist die IL-13-Produktion auch bei TEMRA-, Naiven- und Gedächtnis-Zellen der Nicht-Naiven Zellfraktion unter Einfluss von MSCs größer als im korrespondierenden Well ohne MSCs. In Abwesenheit der MSCs bildeten Gedächtnis-Zellen gesunder Probanden signifikant weniger IL-13 als in Co-Kultur (MSC+ :2,9%; SD \pm 1,8 vs. MSC- :1,0%; SD \pm 0,2). Dagegen verhalten sich IL-13 positive Effektor-Zellen in Co-Kultur mit MSCs gegensätzlich (siehe Abbildung 33). Signifikante Unterschiede bezüglich der von Effektorzellen produzierten Menge an IL-13 konnten zwischen der MSC+ und MSC- Zellpopulation nicht festgestellt werden.

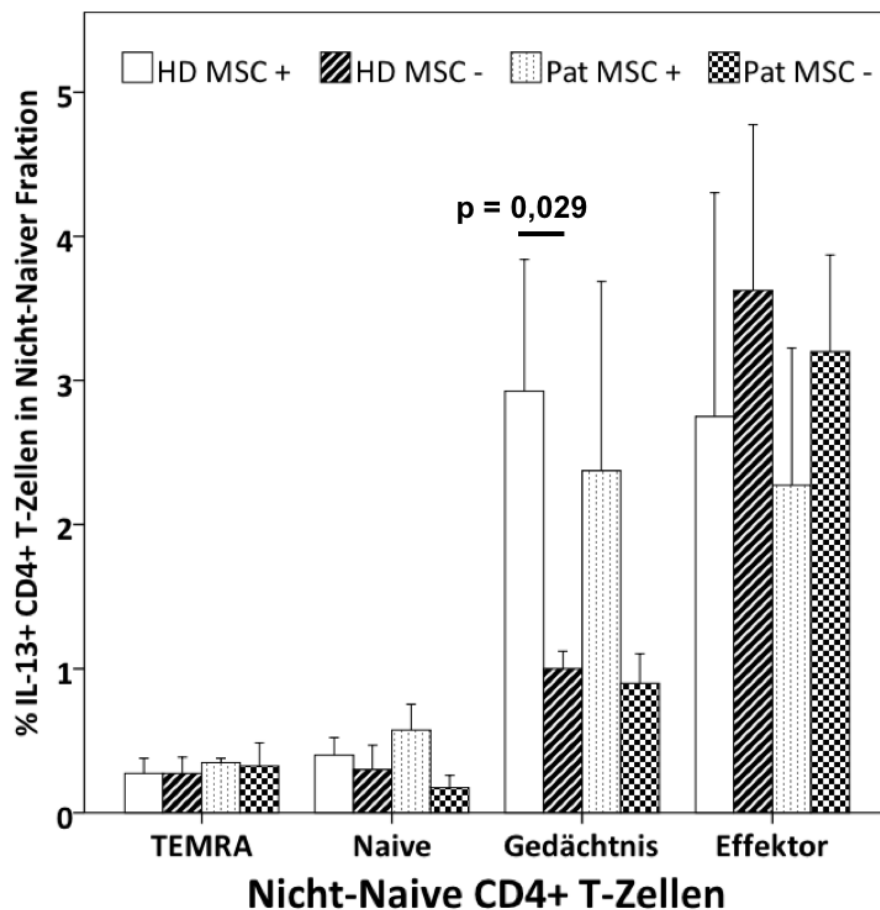


Abbildung 33

Durchschnittliche prozentuale IL-13-Produktion $CD4^+$ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven $CD4^+$ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

5. IL-10-Produktion Nicht-Naive Fraktion

In der Nicht-Naiven Zellfraktion produzierten Tregs gesunder Spender in Kultur mit MSCs signifikant weniger IL-10 als in Kultur ohne MSCs (MSC+ : 0,1%; SD \pm 0,1% vs. MSC- : 0,7%; SD \pm 0,5%). Auch Tregs von Patienten zeigten unter MSC Einfluss ein ähnliches Bild, wenngleich die Ergebnisse in dieser Gruppe nicht signifikant waren. (siehe Abbildung 34).

Die Interpretation der IL-10-Produktion gestaltete sich aufgrund der geringen Menge an gebildetem IL-10 trotz signifikanten Unterschieden zwischen MSC+ und MSC- Zellpopulationen bei gesunden Probanden schwierig.

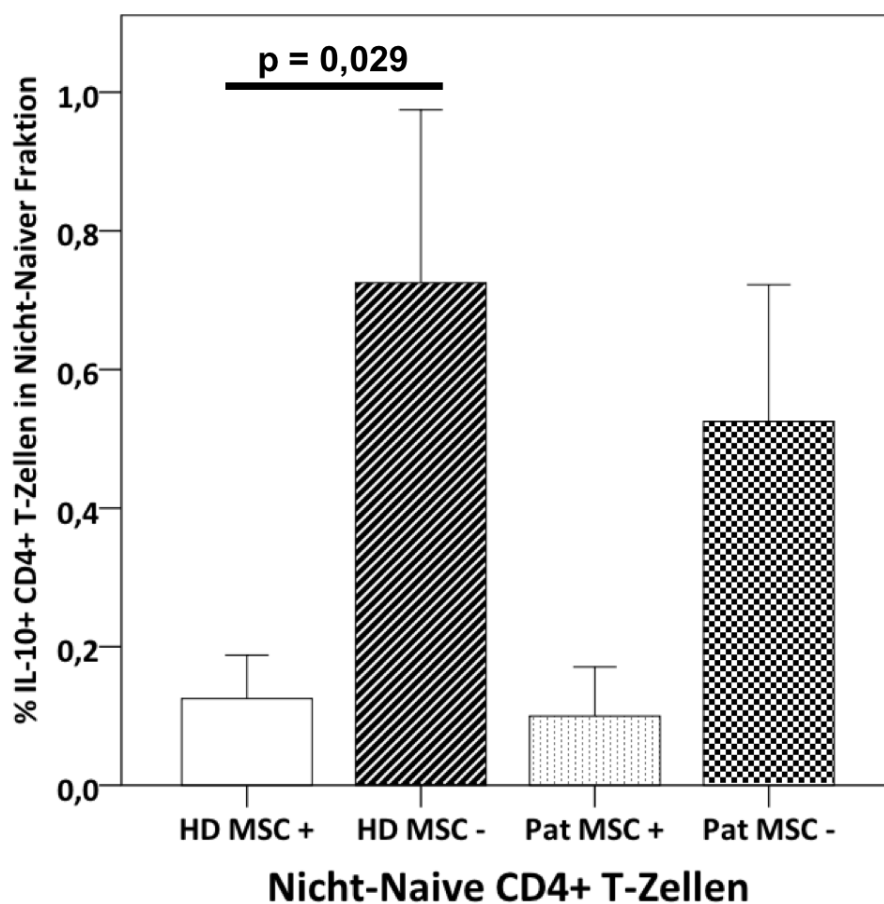


Abbildung 34

Durchschnittliche prozentuale IL-10-Produktion CD4⁺ T-Zellen \pm Standardfehler des Mittelwertes in Tregs bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen.

HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs.

4.5.4. Chemokinrezeptorexpression in der Nicht-Naiven Zellfraktion

Wie in der Naiven Zellfraktion wurde auch in der Nicht-Naiven Zellfraktion der durchschnittliche prozentuale Anteil an CD4⁺ T-Zellen bestimmt, der die Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 exprimiert. Tabelle 39 und Tabelle 40 zeigen die in Summe, von allen Phänotypen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektor-Zellen) exprimierten Chemokinrezeptoren bei gesunden Spendern und Patienten jeweils mit und ohne MSCs. Obwohl kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Rezeptoren in den einzelnen verglichenen Gruppen besteht, scheinen T-Zellen in Gegenwart von MSCs weniger CCR5, CCR6 und CXCR3 auf der Zelloberfläche zu bilden (siehe Abbildung 35). Dies konnte bei T-Zellen gesunder Probanden und bei Patienten beobachtet werden.

Tabelle 39: Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen gesunder Probanden mit/ohne MSC

	Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			Naive CD4 ⁺ T-Zellen (HD)			
	Mit MSCs			Ohne MSCs			
Chemokinrezeptoren	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen							
CCR5	0,6 ± 0,3	0,6	0,2 - 0,8	0,9 ± 0,4	1,0	0,4 - 1,2	0,200
CCR6	2,3 ± 0,5	2,3	1,6 - 2,9	3,2 ± 1,9	2,3	1,9 - 5,9	0,686
CXCR3	1,6 ± 0,8	1,7	0,8 - 2,4	2,3 ± 1,2	1,9	1,5 - 4,0	0,486

Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 positiver CD4⁺ T-Zellen, ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

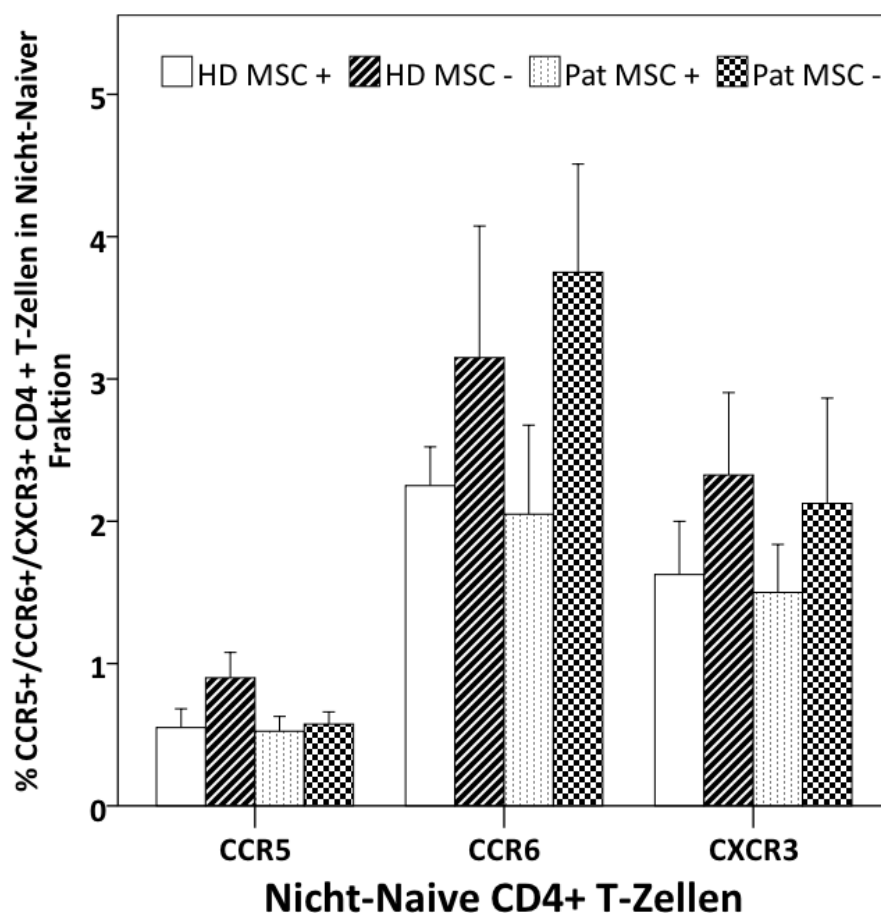
p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % ohne MSCs.

Tabelle 40: Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSC

Chemokinrezeptoren % CD4 ⁺ T-Zellen	Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat) Mit MSCs			Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Pat) Ohne MSCs			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
CCR5	0,5 ± 0,2	0,6	0,3 - 0,7	0,6 ± 0,2	0,6	0,4 - 0,8	0,686
CCR6	2,1 ± 1,3	1,8	0,9 - 3,8	3,8 ± 1,5	3,7	2,3 - 5,3	0,114
CXCR3	1,5 ± 0,7	1,5	0,7 - 2,3	2,1 ± 1,5	1,6	1,1 - 4,3	0,686

Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 positiver CD4⁺ T-Zellen, ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen. Pat = Patienten. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % ohne MSCs.

**Abbildung 35**

Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 exprimierender CD4⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes, ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen. HD = Gesunde Probanden; Pat = Patienten; MSC- = ohne MSCs, MSC+ = mit MSCs.

4.5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 41 fasst die Ergebnisse der Hauptversuche zusammen.

Naive CD4⁺ T-Zellen

Wie in den Etablierungsversuchen verringerten MSCs die Differenzierung des Naiven Phänotyps in der Naiven CD4⁺ Fraktion und bewirkten einen erhöhten Anteil Naiver T-Zellen im Vergleich zum Kontrollwell ohne MSCs. Dies ließ sich sowohl bei Gesunden, als auch bei Patienten beobachten. T-Zellen vom Gedächtnis-Phänotyp waren in Kultur mit MSCs bei Gesunden häufiger vertreten, bei Patienten war der prozentuale Anteil an Gedächtnis-Zellen mit und ohne MSCs ausgeglichen. MSC minderten den Anteil an Effektor-Zellen bei Gesunden und Patienten gleichermaßen. Das Verhältnis von Tregs und TEMRA-Zellen mit und ohne MSCs unterschied sich bei Gesunden und Patienten unwesentlich.

Proliferation, Apoptose und die proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-17 und IL-9 waren unter Einfluss der MSCs bei Gesunden und Patienten vermindert, während das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-13 in Kultur mit MSCs verstärkt gemessen werden konnte. Die Bildung von IL-10 durch Tregs war durch MSCs bei Gesunden und Patienten hingegen vermindert. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 war mit und ohne MSCs bei Gesunden und Patienten vergleichbar, während CCR6 durch die Wirkung der MSCs weniger exprimiert wurde. Die Ausprägung von CXCR3 war bei Patienten mit und ohne MSCs vergleichbar und bei Gesunden durch MSCs herabgesetzt.

Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen

In der Nicht-Naiven CD4⁺ Fraktion war der prozentuale Anteil Naiver Zellen bei Gesunden mit und ohne MSC vergleichbar. Bei den Patienten war der Anteil des Naiven Phänotyps in Kultur mit MSCs ebenfalls erhöht. T-Zellen vom Gedächtnis-Phänotyp waren sowohl bei Gesunden und Patienten durch MSCs verstärkt vorhanden, während der Anteil an T-Zellen vom Effektor-Phänotyp vermindert war. Wie in der Naiven Fraktion unterschied sich das Verhältnis von Tregs und TEMRA-Zellen mit und ohne MSCs bei Gesunden und Patienten nur unwesentlich. Die Proliferation, Apoptose, Zytokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression wurde durch MSCs bei Gesunden und Patienten analog zur Naiven Fraktion beeinflusst. Ausnahmen in der Nicht-Naiven Fraktion bildeten IL-13 und CXCR3. Bei Patienten wurde IL-13 in Kultur mit MSCs weniger produziert und CXCR3 weniger exprimiert.

Tabelle 41: Übersicht Ergebnisse der Hauptversuche

	Naive CD4 ⁺ T-Zellen						Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen					
	Gesunde			Patienten			Gesunde			Patienten		
	MSC+	MSC-	MSC+/MSC-	MSC+	MSC-	MSC+/MSC-	MSC+	MSC-	MSC+/MSC-	MSC+	MSC-	MSC+/MSC-
Phänotyp Naive	++++	+++	↑	+++++	+++	↑	++	++	↔	++	+	↑
Gedächtnis	+++++	++++	↑	++++	++++	↔	++++	++++	↑	++++	++++	↑
Effektor	+	++++	↓	++	++++	↓	++++	++++	↓	+++	++++	↓
TEMRA	+	+	↔	+	+	↔	+	+	↔	+	+	↔
Tregs	+	+	↔	+	+	↔	+	+	↔	+	+	↔
Proliferation	+++	++++	↓	++	++++	↓	+++	++++	↓	+++	++++	↓
Apoptose	+	++	↓	+	++	↓	+	++	↓	+	++	↓
IFN γ	+	+++++	↓	+	++++	↓	++	+++	↓	++	+++	↓
IL-17	+	++	↓	+	+++	↓	++	+++	↓	++	++++	↓
IL-9	+	+++	↓	++	+++	↓	+	++++	↓	+	++++	↓
IL-13	+++	+	↑	+++	+	↑	++	+++	↑	++	+++	↓
IL-10	+	++	↓	+	++	↓	+	++	↓	+	++	↓
CCR5	+	+	↔	+	+	↔	+	+	↔	+	+	↔
CCR6	+	++	↓	++	+++	↓	+	++	↓	+	++	↓
CX3	+	++	↓	+	+	↔	+	++	↓	+	++	↓

Tabelle 41 gibt die Ergebnisse der Hauptversuche für Gesunde und Patienten im Überblick wieder. Die durchschnittlichen prozentualen Anteile CD4⁺ T-Zellen, die für einen der Parameter Phänotyp, Proliferation, Apoptose, Zytokine und Chemokinrezeptoren positiv sind, werden durch eine unterschiedliche Anzahl des Symbols + verdeutlicht. Je größer der prozentuale Anteil, desto größer die Anzahl an +. MSC- = ohne MSCs; MSC+ = mit MSCs; MSC+/MSC- gibt an, wie sich CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs gegenüber CD4⁺ T-Zellen mit MSCs in den verschiedenen Parametern verhalten. ↑ = steigt; ↓ = fällt; ↔ = bleibt gleich.

5. Diskussion

5.1. Funktionale T-Zellsubpopulationen und MSCs

Das immunologische Gedächtnis wird durch unterschiedliche T-Zellsubpopulationen repräsentiert, die sich auch nach Stimulation Naiver T-Zellen in vitro, unterscheiden lassen [178]. Anhand der Oberflächenantigene CD45RA und CD27 konnten die vier Subpopulationen CD45RA⁺CD27⁺ Naive-, CD45RA⁺CD27⁺ Gedächtnis-, CD45RA⁺CD27⁺ Effektor- und CD45RA⁺CD27⁺ TEMRA-Zellen voneinander abgegrenzt werden [179]. Nach Th17 Stimulation isolierter Naiver- und Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von MSCs konzentrierte sich die Ergebnisinterpretation zunächst auf die Phänotypisierung CD4⁺ T-Zellen und die Einteilung in die vier genannten T-Zell Subpopulationen. Ergänzend wurde der prozentuale Anteil an FoxP3⁺CD25⁺CD127⁺ Tregs bestimmt.

Naive Fraktion

Beibehaltung des Naiven Phänotyps unter Co-Kultur mit MSCs in gesunden Probanden und Patienten

Isolierte Naive CD4⁺ T-Zellen gesunder Probanden zeigten unter MSC-Einfluss einen signifikant niedrigeren prozentualen Anteil CD45RA⁺CD27⁺ Effektor-Zellen, während CD45RA⁺CD27⁺ Naive-Zellen und CD45RA⁺CD27⁺ Gedächtnis Zellen höhere prozentuale Anteile aufwiesen als im Kontrollwell ohne MSCs. Auch der prozentuale Anteil CD45RA⁺CD27⁺ TEMRA Zellen war in Co-Kultur mit MSCs geringer. Bis auf den Gedächtnis-Phänotyp, konnte die Verteilung der Phänotypen auch bei isolierten Naiven CD4⁺ T-Zellen von Patienten beobachtet werden. Die Beibehaltung des Naiven Phänotyps in Co-Kultur mit MSCs spiegelt sich in einer aktuellen Arbeit von Mareschi et al. [73] wieder, die den Einfluss von MSCs auf isolierte Naive T-Zellen und Gedächtnis T-Zellen gesunder Probanden untersuchten. Während ohne MSCs ein erhöhter Anteil an Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zur Naiven T-Zellpopulationen registriert werden konnte, verhielt sich der Anteil an Gedächtnis und Naiven T-Zellen in Kultur mit MSCs gegensätzlich. Zusätzlich analysierten Mareschi et al. CD4⁺ und CD8⁺ Effektor-Gedächtnis-T-

Zellen und beobachteten insgesamt eine Verminderung der Gedächtniszellen durch MSCs. Um die Ergebnisse von Mareschi et al. in Bezug auf die eigenen Ergebnisse richtig interpretieren zu können, muss betont werden, dass CD45RA⁺CD27⁻ Effektor-Zellen in der Literatur häufig als Effektor-Gedächtnis-T-Zellen bezeichnet werden und der Gedächtnis T-Zellpopulation zugeordnet werden.

Vor dem Hintergrund, dass sich MSCs in den eigenen Ergebnissen fördernd auf den Anteil Naiver CD4⁺ T-Zellen auswirken, konnte durch Batorov et al. [180] zum ersten Mal in vivo gezeigt werden, dass autologe MSCs die Wiederherstellung von Lymphozyten in frühen Phasen nach autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation steigern können. Dieser Effekt war insbesondere bei Naiven CD4⁺ T-Zellen nachzuweisen, aber auch bei Gedächtniszellen.

Im Gegensatz dazu ließen sich durch ihr entsprechendes Antigen aktivierte Naive- und Gedächtnis-Zellen durch MSCs ebenfalls hemmen. Dies zeigte sich in den Parametern antigenspezifische Proliferation, IFN γ -Produktion und zytotoxische Aktivität [142].

Verminderung des Effektor Phänotyps unter Co-Kultur mit MSCs in gesunden Spendern und Patienten

In dieser Arbeit war der Anteil an CD4⁺ T-Zellen vom Effektor-Phänotyp durch MSC im Vergleich zu den anderen drei Subpopulationen teilweise signifikant vermindert. Bislang mangelt es an Studien, die den Einfluss der MSCs auf die Differenzierung von Gedächtnis-, Naiven-, TEMRA- und Effektor-Zellen untersucht haben. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse deuten darauf hin, dass einzelne T-Zell Subpopulationen durch MSCs unterschiedlich stark moduliert werden [159]. Die Resultate von Aksu et al. [181] demonstrieren, dass lösliche Faktoren, die von MSCs produziert werden, die Funktion dendritischer Zellen verändern und dadurch die Differenzierung von Effektor-Zellen beeinflussen. Die eigenen Ergebnisse legen nahe, dass MSCs die T-Zellentwicklung von der Naiven T-Zelle bis zur TEMRA-Zelle beeinflussen und unter Th17 polarisierenden Bedingungen dafür sorgen, dass isolierte Naive T-Zellen ihren Phänotyp beibehalten. In vivo Experimente zeigen, dass MSCs mit verschiedenen Immunzellen in Kontakt treten, um eine Immunantwort zu modulieren. So vermuten Lim et al. [182], dass MSCs die Immunantwort in vivo hauptsächlich in dem Bereich regulieren, in dem dendritische Zellen T-Zellen aktivieren. Im Kontrast dazu demonstrierten Krampera et al.

[142], dass der inhibitorische Effekt durch MSCs nicht die Anwesenheit von APCs erfordert und nicht durch $CD4^+$ / $CD25^+$ regulatorische T-Zellen vermittelt wird.

MSCs scheinen keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zu benötigen um ihre immunmodulierende Wirkung auszuführen

Die Verwendung von Transwell®-Systemen in den eigens durchgeführten Experimenten zeigt, dass MSCs zumindest keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zu APCs oder T-Zellen benötigen, um ihre immunmodulierende Wirkung auszuführen. Ob die Anwesenheit der APCs für den inhibitorischen Effekt der MSCs generell nicht erforderlich ist, kann nicht abschließend beantwortet werden, da APCs für eine suffiziente Proliferation der T-Zellen in den Experimenten erforderlich waren.

Ein erhöhter Anteil an Tregs war in Kultur mit MSCs nicht zu verzeichnen und lässt sich mit den Ergebnissen von Krampera et al. [142] vereinbaren.

Nicht-Naive Fraktion

Eine Stabilisierung des Naiven Phänotyps konnte bei Patienten auch in der Nicht-Naiven Fraktion festgestellt werden

MSCs beeinflussten ebenfalls die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Subpopulationen in der Nicht-Naiven $CD4^+$ Fraktion. Der Anteil $CD4^+$ Effektor-Zellen war in Kultur mit MSCs, sowohl bei Patienten, als auch bei Gesunden kleiner, als in Abwesenheit von MSCs. Unter Einfluss der MSCs waren Gedächtnis-Zellen bei gesunden Probanden und Patienten im Vergleich zur Kultur ohne MSCs vermehrt vorhanden. $CD4^+$ T-Zellen der Naiven und TEMRA Subpopulation waren in Anwesenheit der MSCs bei Patienten vermehrt und bei gesunden Probanden vermindert vertreten. Somit kann vor allem bei den Patienten, analog zur Naiven Fraktion, von einer Stabilisierung des Zellphänotyps ausgegangen werden.

Die initiale prozentuale Verteilung der T-Zell Subpopulationen ist bei jeder einzelnen Blutprobe der Patienten und gesunden Probanden individuell unterschiedlich [73]. Das bedeutet wiederum, dass sich die MSCs bei jeder einzelnen Probe von Patienten und Gesunden stabi-

lisierend auf den Zellphänotyp auswirken, die prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen variierten jedoch von Blutprobe zu Blutprobe bei Gesunden und Patienten.

5.2. Beeinflussung von Proliferation und Apoptose durch MSCs

Verminderung der Proliferation durch MSCs in der Naiven- und Nicht-Naiven Fraktion

Die Proliferationsaktivität konnte durch MSCs in beiden isolierten Zellfraktionen (Naive- und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen) gemindert werden, in der Nicht-Naiven Fraktion gesunder Spender signifikant.

In der Literatur weisen mehrere Arbeiten darauf hin, dass MSCs die Proliferation von T-Zellen vermindern können [147, 148, 183-185]. Die Fähigkeit der MSCs die T-Zell-Proliferation zu hemmen, konnte in vivo sowohl bei Patienten mit schwerer therapieresistenter Graft-versus-Host-Reaktion [186], als auch im Maus-Modell mit akuter Graft-versus-Host-Reaktion nachgewiesen werden [155, 183]. Obwohl die meisten Studien einen proliferationshemmenden Charakter der MSCs in Bezug auf T-Zellpopulationen feststellen konnten, weisen einige Arbeiten auf eine Steigerung der Proliferation durch MSCs hin [187, 188]. Die Ergebnisse von Bocelli-Tyndall et al. [188] verdeutlichen, dass MSCs eine Art Homöostase zwischen einer Verstärkung und einer Verminderung der T-Zell-Proliferation herstellen können, die auch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt zustande kommt. Weiterhin scheint die Förderung oder Hemmung der T-Zell-Proliferation von den verwendeten Zellzahlen der MSCs abhängig zu sein [187]. Die Tatsache, dass in einigen Arbeitsgruppen unterschiedliche Zellzahlen der MSCs zur Inhibierung der T-Zell Proliferation verwendet wurden, liegt nach Najar et al. [187] am wahrscheinlichsten an Zellkulturbedingungen. So kann die Oberfläche der Böden in den Wells, die die Zelldichte in einer Co-Kultur, bei identischer Zellkonzentration bestimmt, oder die Auswahl der Responderzellen, wie beispielsweise PBMCs, Monozyten oder isolierte T-Zellen, die Wirkung der MSCs auf die Proliferation verändern.

In den eigenen Experimenten ließ sich in den Etablierungsversuchen bei einer Zellzahl von $2,5 \times 10^4$ MSCs insgesamt eine Hemmung der T-Zell Proliferation sowohl in einer 48-Well-Platte als auch in einer 24-Well-Platte mit flachem Boden der Wells beobachten. Bei weiterer Steigerung der MSC Zellzahl kam es zum Zelltod und zur Ablösung der plastikadhärenten MSCs. In Folge dessen wurde aus Gründen der einfacheren Handhabung und der Möglichkeit

der Verwendung von Transwell®-Systemen mit einer 24-Well-Platte und einer einheitlichen Zellzahl von $2,5 \times 10^4$ MSCs in den Hauptversuchen gearbeitet.

Weiterhin ist von Relevanz, ob es sich um murine oder humane MSCs handelt und ob diese aus Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnurblut oder Plazentagewebe entnommen wurden [187]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich auf humane MSCs aus Beckenkammpongiosa zurückgegriffen.

Die Hemmung der Proliferation konnte sowohl im Transwell®-System, als auch unter direktem Zell-Zell-Kontakt festgestellt werden

In den Etablierungsversuchen wurden MSCs und T-Zellen zunächst unter direktem Zell-Zell-Kontakt co-kultiviert. Im Verlauf erfolgte die Etablierung der Transwell®-Methode. Dadurch hatten MSCs und T-Zellen nur noch über das Zellmedium Kontakt miteinander. Die Proliferationshemmung war in beiden Verfahren nachweisbar. Bereits 2002 erwähnten Di Nicola et al. neben direktem Zellkontakt auch lösliche Faktoren („soluble factors“) als Ursache der Proliferationshemmung [148]. Mittlerweile sind eine Vielzahl biologischer Faktoren entdeckt worden, die von Stammzellen sezerniert werden und in Wundheilungsprozessen und der Immunmodulation eine zentrale Rolle spielen. Indolamin-2,3-Dioxygenase kann die T-Zell Proliferation hemmen und wird abhängig vom Aktivierungszustand der MSCs, jedoch nicht konstitutiv exprimiert [189]. Hepatocyte growth factor (HGF) wird von MSCs sezerniert, supprimiert die T-Zellfunktion auf verschiedenen Ebenen [190] und kann die Proliferation Anti-CD3/CD28 aktivierter peripherer Blutlymphozyten (PBLs) vermindern [191]. Neben HGF kann die Produktion von TGF- β durch MSCs das Wachstum von T-Zellpopulationen regulieren [148]. In MSC/T-Zell Co-Kulturen konnte eine signifikante Akkumulation von Prostaglandin E2 (PGE2) gemessen werden. Gereinigtes PGE2 war mit einer dosisabhängigen Inhibition der T-Zell Proliferation und IL-17-Produktion assoziiert [75]. Galektinen, eine Familie β -Galaktosid-bindender Proteine, wird ebenfalls eine tragende Rolle in der Regulierung der T-Zell Proliferation zugesprochen. Sowohl für Galektin-1, als auch für Galektin-3 konnte die immunsupprimierende, proliferationshemmende Wirkung gezeigt werden. Beide Proteine ließen sich auf der Zelloberfläche von MSCs und in Zellkulturüberständen nachweisen. Gen-Knockdown von Galektin-1 und -3 hob das immunsuppressive Potential der MSC nahezu auf [192].

Auch die Proliferation weiterer Zellpopulationen, wie Makrophagen oder endothelialer Progenitorzellen kann durch MSC, über hauptsächlich parakrin wirkende Moleküle, beeinflusst werden. Zu diesen Molekülen werden unter anderem, Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Epidermal growth factor (EGF), Vascular endothelial growth factor α (VEGF- α), Stromal derived factor-1 (SDF1), Erythropoetin (EPO), Angiopoietin 1 (ANGPT1), Keratinocyte growth factor (KGF) und Macrophage inflammatory protein 1 α und β (MIP-1 α und MIP-1 β) gezählt [193].

Auch wenn MSCs durch eine Vielzahl löslicher Faktoren mit T-Zellen interagieren können, sollte betont werden, dass direkter Zell-Zell-Kontakt zu einer verstärkten Immunregulation und Supprimierung der Proliferation führen kann [194]. In den Etablierungsversuchen dieser Arbeit war die Supprimierung der T-Zell Proliferation und die Immunregulation durch MSC unter direktem Zell-Zell-Kontakt und über lösliche Faktoren mittels Transwell®-System vergleichbar.

Verminderung der T-Zell-Apoptose durch MSCs

Neben dem hemmenden Charakter auf die T-Zell Proliferation, war auch die Apoptoserate in Gegenwart von MSCs vermindert. Zusätzlich wurden T-Zellen im Frühstadium von T-Zellen im Spätstadium der Apoptose abgegrenzt. In beiden isolierten Zellfraktionen konnte der Anteil apoptotischer Zellen durch MSCs vergleichbar reduziert werden, wobei Patienten im Gegensatz zu gesunden Probanden mehr CD4⁺ T-Zellen im Frühstadium der Apoptose aufwiesen. Auch bei Zellen in der Apoptosespätphase war die Inhibition des programmierten Zelltods durch MSCs zu erkennen, gleichzeitig konnten bei Patienten und gesunden Kontrollen ähnliche Apoptoseraten verglichen werden.

Apoptoseinduktion und Apoptoseinhibition durch MSCs werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Trotz intensiver Studien über den immunsupprimierenden Effekt von MSCs, konnte ihr Einfluss auf die Apoptose verschiedener T-Zell Populationen bislang nicht eindeutig geklärt werden. Xu et al. [195] demonstrierten 2007 die IL-6-abhängige, inhibitorische Wirkung von MSCs auf die Apoptose gereinigter T- und B-Zellen. Demnach reguliert IL-6 die Apoptose abhängig von direktem Zell-Zell-Kontakt zwischen MSCs und T-Zellen. Benvenuto et al. [153] konnten erstmals zeigen, dass MSCs das Überleben von T-Zellen fördern können, wenn die T-Zellen Stressbedingungen ausgesetzt werden, die zur Apoptose führen. Anstatt

die Apoptose von T-Zellen zu fördern, hemmen MSCs selektiv und irreversibel die Proliferation der T-Zellen, indem sie die Cyclin-D2-Expression herunterregulieren, ohne in Phasen der frühen T-Zell Aktivierung einzugreifen. Damit induzieren MSCs in T-Zellen eine Tolerierung des Zellzyklusarrests [196]. Wie bereits bei T-Zellen beobachtet können MSCs auch Tumorzellen in der G₀-Phase des Zellzyklus arretieren. Dieser Effekt tritt jedoch nur vorübergehend, mit einem verminderten Anteil spontan apoptotischer Zellen auf und führt im Verlauf zur Proliferation [197]. Eine Hemmung der T-Zell Proliferation bei verminderter Apoptose in Gegenwart von MSCs konnte in dieser Arbeit ebenfalls erkannt werden, wobei vereinzelt auch eine gesteigerte Proliferation der T-Zellen in Kultur MSCs beobachtet werden konnte.

Im Kontrast dazu, wird die immunsuppressive Wirkung von MSCs häufig auch mit Apoptoseinduzierung aktivierter T-Zellen erklärt. Eine erhöhte Apoptoserate durch den Einfluss der MSCs ließ sich in den eigens durchgeführten Experimenten trotz T-Zell Aktivierung nicht erkennen. In einer Arbeit von Akiyama et al. [67] wurden Mäusen MSCs aus Knochenmark infundiert und die Apoptoserate der T-Zellen bestimmt. Im Verlauf konnte eine FAS/FasL vermittelte transiente Apoptoseinduzierung der T-Zell Populationen beobachtet werden. Akiyama et al. wiesen jedoch auch darauf hin, dass MSCs in einem Co-Kultur System mit Naiven T-Zellen keine Apoptose auslösen konnten. Außerdem könnte das von MSCs exprimierte IDO für die Apoptoseinduzierung aktivierter T-Zellen verantwortlich sein [198].

Die Vermittlung der apoptoseinhibierenden Wirkung in den eigens durchgeführten Experimenten ließ aufgrund der verwendeten Transwell®-Methode am ehesten an lösliche Faktoren denken. Ein möglicher Grund für die kontroverse Diskussion über Apoptoseinduktion und Apoptoseinhibierung von MSCs könnte, wie schon in Bezug auf die T-Zell Proliferation erwähnt, an unterschiedlich verwendeten Zellzahlen der MSCs liegen. Niedrige MSC Zellzahlen werden mit mäßiger Immunsuppression oder sogar Aktivierung des Immunsystems in Verbindung gebracht, während hohe Zellzahlen mit signifikanter Immunsuppression einhergehen [198, 199]. Durch die einheitliche Verwendung von $2,5 \times 10^4$ MSCs/Well in den Hauptversuchen dieser Arbeit lässt sich im Vergleich zur Literatur keine valide Aussage treffen, inwieweit unterschiedliche Zellzahlen der MSCs die Apoptose von T-Zellen beeinflussen.

5.3. Zytokinproduktion

Insgesamt verminderten MSCs die Produktion proinflammatorischer Zytokine IFN γ , IL-17 und IL-9 in der Naiven und Nicht-Naiven Fraktion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich MSCs auch auf das Zytokinprofil verschiedener T-Zell Subpopulationen auswirken können. Die meisten Publikationen beschreiben einen inhibitorischen Einfluss auf die Th1 und Th17 Differenzierung, die mit einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine einhergeht [69, 75, 145, 146, 159, 200-202]. Übereinstimmend konnte in Kultur mit MSCs, in beiden isolierten Zellfraktionen insgesamt eine geringere IL-9-, IL-17- und IFN γ -Produktion gezeigt werden.

Nach Th17 Stimulation wurden die T-Zell Subpopulationen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektorzellen anhand der Oberflächenmarker CD45RA und CD27, wie bereits beschrieben, differenziert und die Zytokinproduktion jeder einzelnen Subpopulation gemessen. Bezüglich isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen von Patienten, war die IL-9- und IL-17-Produktion CD45RA⁺CD27⁻ Effektor-Zellen in Kultur mit MSCs signifikant vermindert. Bei gesunden Probanden war die Bildung von IFN γ durch CD45RA⁺CD27⁺ Naive- und CD45RA⁺CD27⁺ Gedächtnis-Zellen durch MSCs signifikant reduziert.

5.3.1. Interferon gamma (IFN γ)

In der Naiven Fraktion supprimierten MSCs die IFN γ -Produktion in allen Subpopulationen

Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit konnten in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Laranjeira et al. [159] vergleichbare Effekte humaner MSCs des Knochenmarks auf die Zytokinproduktion verschiedener funktionaler Subpopulationen von gesunden Spenderprobanden erkennen. Laranjeira et al. definierten die einzelnen Subpopulationen wie folgt in Naive- (CD45RA⁺CD27⁺), Zentrale-Gedächtnis-(CD45RA⁺CD27⁺) und Effektor T-Zellen (CD45RA⁺CD27⁻). In Kultur mit MSCs wiesen Sie auf eine verminderte Anzahl IFN γ -positiver CD4⁺ T-Zellen in drei, der vier untersuchten T-Zell Subpopulationen hin, mit Ausnahme von Naiven CD4⁺ T-Zellen. Der inhibitorische Effekt der MSCs auf die IFN γ -Produktion war bei dieser Subpopulation nicht nachzuweisen.

In den eigenen Experimenten konnten MSCs die IFN γ -Produktion in allen Subpopulationen der Naiven Zellfraktion bei gesunden Probanden und Patienten vermindern. Die Suppression der IFN γ -Produktion war in den Subpopulationen mit dem größten Anteil IFN γ positiver CD4⁺ T-Zellen am deutlichsten ausgeprägt.

In der Nicht-Naiven Fraktion war die IFN γ -Produktion bei Naiven- und TEMRA-Zellen im Beisein von MSCs gesteigert

Hingegen war die IFN γ -Produktion der Naiven- und TEMRA-Zellen in der Nicht-Naiven Fraktion durch MSCs gesteigert. In Hinblick auf die gesteigerte IFN γ -Produktion sollte nicht unerwähnt bleiben, dass humane MSCs über die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) neben den häufig beschriebenen immunsuppressiven Funktionen immunmodulierend wirken und eine Immunantwort über eine gesteigerte T-Zell Proliferation und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine mitunter sogar verstärken können [203]. Um ihrer supprimierenden Funktion auf Immunreaktionen nachkommen zu können, gibt es Hinweise darauf, dass MSCs zunächst selbst durch proinflammatorische Zytokine wie IFN γ aktiviert werden müssen. Da eine konstante immunsuppressive Wirkung der MSCs unter physiologischen Bedingungen nicht sinnvoll erscheint, deutet vieles darauf hin, dass die immunsuppressiven Fähigkeiten der MSCs nicht angeboren sind, sondern durch proinflammatorische Zytokine, allen voran IFN γ in Kombination mit TNF- α , IL-1 α und IL-1 β induziert wird [203, 204]. Im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus könnte somit eine vermehrte Ausschüttung von IFN γ , zusammen mit weiteren Zytokinen, eine verstärkte Aktivierung von MSCs bewirken, die eine Immunreaktion beschränken und letztlich für die verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine verantwortlich sind [203].

5.3.2. Interleukin 17 (IL-17)

Mehrere Arbeiten verdeutlichen, dass der Anteil IL-17-positiver T-Zellen und die IL-17-Produktion durch MSCs verringert wird [70, 75, 145, 157, 200, 201]. Aktuell fanden Wang et al. [205] heraus, dass MSCs aus humaner Plazenta suppressiv auf Th17-Zellen wirken und dafür sowohl der parakrin wirkende Faktor IL-25 als auch das Zelloberflächenmolekül Programmed death ligand-1 (PD-L1) erforderlich sind.

Andererseits weisen einige Arbeitsgruppen vermehrt Th17-Zellen und eine gesteigerte IL-17-Produktion unter MSC Wirkung nach [149, 150, 206, 207]. In diesem Zusammenhang untersuchten Darlington et al. [133] die regulierende Funktion MSCs auf Th1 und Th17 Zellen und stellten eine verminderte Th1 Antwort, bei gesteigerter Th17 Antwort und IL-17-Produktion fest. Humane MSCs die mit IL-1 β vorstimuliert wurden, konnten diesen Effekt verstärken. Aus menschlicher Nabelschnur gewonnene MSCs fördern nach Ren et al. [158] die IL-17-Produktion in humanen PBMCs und CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit SLE und gesunden Spendern [158].

Unter Einfluss der MSCs kam es bei T-Zellen der Naiven Subpopulation in der Naiven und Nicht-Naiven Fraktion zu einer gesteigerten IL-17-Produktion

Wie schon angesprochen, konnte in dieser Arbeit in beiden isolierten Zellfraktionen für gesunde Probanden und Patienten die insgesamt suppressive Wirkung der MSCs auf die IL-17-Produktion gezeigt werden. Abgesehen von Effektor-Zellen war die IL-17-Bildung in den weiteren Subpopulationen durch MSCs jedoch nicht einheitlich herabgesetzt. So konnte in den eigens durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass T-Zellen der Naiven Subpopulation im Beisein der MSCs mehr IL-17 in der Naiven und Nicht-Naiven CD4⁺ Zellfraktion der Patienten produzierten. Obwohl in einer Studie von Hsu et al. [150] keine erhöhte IL-17-Produktion bei Naiven CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen in Kultur mit MSC festgestellt werden konnte, stimulierten MSCs die IL-17-Produktion bei CD4⁺ CD45RO⁺ Gedächtnis-Zellen und lassen die Vermutung zu, dass die Zytokinproduktion in verschiedenen T-Zellsubpopulationen durch MSCs unterschiedlich reguliert wird. Dazu passt auch die durch Laranjeira et al. [159] festgestellte, reduzierte Hemmung der IFN γ -Produktion in der Naiven Subpopulation durch MSCs. Diese gegensätzlich erscheinenden Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten einer Arbeit von Chan et al. [208] die MSCs neben ihrem immunsuppressiven Charakter auch eine antigenpräsentierende Eigenschaft zusprechen. Dabei scheint die Ausprägung der antigenpräsentierenden Funktion der MSCs in vitro mit der Höhe des IFN γ -Spiegels im umgebenden Milieu zusammenzuhängen. Bei niedrigen IFN γ -Spiegeln beobachteten Chan et al. eine Steigerung der Expression an MHC-II-Molekülen auf MSCs und eine Zunahme der antigenpräsentierenden Funktion, wohingegen hohe IFN γ -Spiegel das Gegenteil bewirkten. Diese Eigenschaft der MSCs, in proinflammatorischem Milieu immunsuppressiv zu wirken, aber gleich-

zeitig bei niedrigen IFN γ -Spiegeln, eine antigenpräsentierende Funktion übernehmen zu können, passt zu den eigenen Resultaten, die insgesamt die immunsuppressive Eigenschaft der MSCs verdeutlichen, aber in einzelnen Subpopulationen zeigen, dass MSC nicht nur proliferationsfördernd, sondern ebenfalls mit einer erhöhten Zytokinproduktion im Zusammenhang stehen können.

5.3.3. Interleukin 9 (IL-9)

Die Wirkung der MSCs auf IL-9 produzierende T-Zellen ist bislang kaum geprüft worden. Mittlerweile ist bekannt, dass IL-9 von vielen Zellen des Immunsystems produziert werden kann. Neben Mastzellen [209] und Th2 Zellen [210], kann IL-9 von natürlichen Killerzellen (NK) [211], Th9 [212] und Th17 Zellen [213], Tregs [214], Innate Lymphoid Cells (ILC) [215] und CD8⁺ T-Zellen die IL-9 exprimieren können (Tc9 Zellen) [216] produziert werden.

IL-9 reguliert die Immunantwort und kann sie sowohl steigern als auch hemmen. Generell erscheint die Rolle von IL-9 nachteilig in Bezug auf Allergien und Autoimmunität. Jedoch kann IL-9 bei parasitären Infektionen helfen, das Pathogen zu beseitigen und bei Hauttransplantationen die Aufrechterhaltung eines toleranten Milieus fördern [217].

Es zeigte sich, dass Th17 Zellen große Mengen IL-9 produzieren können, das sich auf Th17 Zellen und Tregs auswirkt. IL-9 differenziert Naive CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von TGF β in Richtung Th17 Zellen. Paradoxerweise wirkt sich IL-9 auch auf Natural Tregs (nTregs) aus und verstärkt deren suppressive Funktion in vitro und in vivo. Mäuse, welchen der IL-9 Rezeptor fehlt (IL-9R^{-/-}), exprimieren in der experimentellen Autoimmunencephalomyelitis einen schwereren Verlauf und haben einen Defekt in der suppressiven Aktivität der Tregs [218].

Kürzlich demonstrierten Ciccia et al. [219] zum ersten Mal, dass IL-9 und Th9 Zellen in Synovialgewebe von RA-Patienten überexprimiert sind und mit dem Grad der histologischen Organisation von B- und T-Zellen in ektopen lymphatischen Strukturen korrelieren. Der Anteil von Th9 Zellen unter peripheren Blutzellen war bei RA Patienten ebenfalls erhöht und vergrößerte sich, nach in vitro Exposition durch citrullinierte Peptide.

MSCs verringerten die IL-9-Produktion besonders bei Effektor- und Gedächtnis-Zellen

In beiden isolierten Zellfraktionen war der Anteil IL-9 exprimierender CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs insgesamt verringert. Gedächtnis- und Effektorzellen wiesen bei gesunden

Spendern und Patienten unter den vier analysierten Subpopulationen den größten Anteil IL-9 positiver T-Zellen auf, gleichzeitig war auch der repressive Einfluss durch MSCs in diesen Subpopulationen am größten. In Kultur mit MSCs verhielt sich die IL-9-Produktion der Naiven Subpopulation hingegen konträr zur Gedächtnis und Effektor Subpopulation.

Die Anzahl IL-9 positiver TEMRA-Zellen war gegenüber den anderen Subpopulationen am geringsten. In der Naiven Fraktion produzierten TEMRA-Zellen in Co-Kultur mit MSC weniger IL-9, in der Nicht-Naiven Fraktion dagegen mehr IL-9 in Kultur mit MSCs.

Die Ergebnisse zeigen, dass der in der Literatur beschriebene, supprimierende Effekt der MSCs auf die IL-9-Produktion aller isolierten CD4⁺ T-Zellen zwar beobachtet werden kann, jedoch verhalten sich einzelne T-Zell Subpopulationen in Kultur mit MSCs, bezüglich der IL-9-Produktion, unterschiedlich [159, 220].

5.3.4. Interleukin 13 (IL-13)

IL-13 ist ein Zytokin, dass von T-Zellen [221] und dendritischen Zellen [222] produziert wird. Durch antigenspezifische und polyklonale Aktivierung konnten Waal Malefyt et al. [221] die IL-13-Produktion in CD4⁺ und CD8⁺ Th0, Th1 und Th2 Zellklonen induzieren. Nach Minty et al. [223] inhibiert rekombinant hergestelltes IL-13, die durch LPS induzierte Zytokinproduktion, in menschlichen PBMCs. Darüber hinaus wirkt es synergistisch zu IL-2 in Bezug auf die Regulation der IFN γ Synthese in großen granulären Lymphozyten und scheint die Immunantwort entscheidend zu kontrollieren. Es konnte aktuell herausgefunden werden, dass IL-13 den alternativen Aktivierungsstatus M2a in Transplantat-infiltrierenden Makrophagen und Mikrogliazellen induziert und damit die Induktion alloreaktiver CD8⁺ T-Zellen limitiert. Als M2a-Makrophagen werden alternativ aktivierte Makrophagen bezeichnet, die IL-4 oder IL-13 ausgesetzt waren [224]. In der Folge führte die IL-13 vermittelte Modulation zu einem verlängertem Transplantatüberleben sowohl in Muskel-, als auch in Hirngewebe von immun-kompetenten Mäusen [225]. Nach de Vries et al [226] ist IL-13 hauptsächlich ein antiinflammatorisches Zytokin, das speziell die Produktion von IgE in B-Zellen anregt und somit zur Initiation und Aufrechterhaltung von IgE-vermittelten allergischen Prozessen beiträgt [226].

MSCs steigerten die IL-13-Produktion bei TEMRA-, Naiven- und Memory-Zellen

In unseren Experimenten, zeigten TEMRA-, Naive- und Memory-Zellen der isolierten Naiven Fraktion in Co-Kultur mit MSC eine gesteigerte, in der Naiven Subpopulation gar eine signifikant gesteigerte IL-13-Produktion. Effektor-Zellen verhielten sich gegensätzlich und zeigten eine verminderte IL-13-Produktion. Die Ergebnisse ließen sich sowohl bei gesunden Spendern als auch bei Patienten nachweisen. In der isolierten Nicht-Naiven Fraktion war die Bildung von IL-13 mit der der isolierten Naiven Fraktion vergleichbar. In vitro Experimente von Ghannam et al. [145], konnten die niedrigere IL-13-Produktion von T-Zellen unter Th17 polarisierenden Bedingungen bestätigen, sofern sich diese in Absenz von MSCs befanden [145]. In Gegenwart porciner MSCs aus Lungengewebe produzierten mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierte PBMCs eine signifikant verringerte Menge IFN γ , während ein Anstieg der IL-4 und IL-13-Produktion verzeichnet werden konnte. Diese Ergebnisse suggerieren, dass MSCs die T-Zell-Antwort in Richtung Th2 Phänotyp lenken und korrespondieren mit den erhöhten IL-13 Spiegeln in den eigenen Ergebnissen [227]. Kavanagh und Mahon [228] konnten hingegen an einem mit Ovalbumin sensitivierten Mausmodell demonstrieren, dass murine, allogene MSCs die IL-13- und IL-4-Produktion in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und in Kultur mit Splenozyten hemmen konnten. Gleichzeitig war die Produktion von IL-10 erhöht und deutete auf die Induktion einer Treg-Population hin. Andererseits konnte herausgefunden werden, dass humane Naive CD4⁺CD45⁺ T-Zellen in Kultur mit humanen MSCs signifikant mehr IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, bei Etablierung der Co-Kultur unter Th17 polarisierenden Bedingungen, bildeten [145].

5.3.5. Interleukin 10 (IL-10)

Fiorentino, Bond und Mossmann [229] charakterisierten erstmals ein Zytokin, das von Th2 Zellklonen produziert wird und die Synthese verschiedener Zytokine von Th1 Zellklonen hemmt. Sie nannten dieses Zytokin Cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF), welches heute als IL-10 bezeichnet wird. IL-10 spielt eine wichtige Rolle in der Balance zwischen protektiver und pathogener zellulärer Immunantwort [230].

IL-10 kann von Makrophagen [231], Monozyten [232], T-Zellen [233], dendritischen Zellen [234], B-Zellen [235] NK Zellen [236] und MSCs [237] produziert werden. Obwohl die Mehrheit der Studien IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin beschreibt, wurde auch eine IL-10

induzierte TNF- α -Produktion bei PBMCs nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) beobachtet.

MSCs bewirkten eine Hemmung der IL-10-Produktion in der Naiven und Nicht-Naiven Fraktion

In den eigens durchgeführten Experimenten wirkten sich MSCs hemmend auf die IL-10-Produktion von Tregs aus. Tregs der Naiven Fraktion von gesunden Probanden und Patienten zeigten in Kultur mit MSCs eine geringere IL-10-Produktion als in den Kontrollwells ohne MSCs. In der Nicht-Naiven Zellfraktion bewirkten MSC ebenfalls eine Hemmung der IL-10-Produktion bei Patienten und eine signifikante Hemmung der IL-10-Produktion bei Gesunden.

Die IL-10-Produktion regulatorischer T-Zellen war insgesamt gering. Eine denkbare Erklärung könnte in den von Nasef et al. [194] beschriebenen Experimenten erkennbar sein, in denen die erhöhte IL-10-Genexpression T-Zell-kontaktabhängig war, während die Hauptversuche dieser Arbeit mit dem Transwell®-System durchgeführt wurden. Sowohl aus Knochenmark, als auch aus Fettgewebe isolierte MSCs, die mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6 und IL-23 vorstimuliert wurden, sezernierten zwar vermehrt TGF β aber kein IL-10 [238]. Eine weitere aktuelle Arbeit konnten die erniedrigte IL-10-Produktion unter MSC Einfluss ebenfalls bestätigen [159]. Qu et al. [144] stellten dagegen eine erhöhte IL-10-Produktion unter Th17-polarisierenden Bedingungen fest, die mit erniedrigter Th17 Zelldifferenzierung einherging, wenn MSCs mit CD4⁺ T-Zellen co-kultiviert wurden. Neutralisierende Antikörper gegen IL-10 resultierten wiederum in einer verstärkten IL-17-Produktion, assoziiert mit der vermehrten Expression von Ror γ t, dem wichtigsten Transkriptionsfaktor der Th17 Zellen. Die Separation von MSCs und T-Zellen durch die Verwendung von Transwells® verhinderte die Inhibition der Th17 Zelldifferenzierung nicht.

5.3.6. CCR5-, CCR6- und CXCR3-Expression

Neben dem Einfluss der MSCs auf die Zytokinproduktion wurde auch die Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 CD4⁺ T-Zellen untersucht.

Chemokine umfassen eine große Familie kleiner Zytokine mit vier konservierten Cysteinen, verbunden durch Disulfidbrücken. Die beiden Unterfamilien, CXC und CC Chemokine, werden gemäß der Position der ersten beiden Cysteine unterschieden, die entweder durch eine Aminosäure getrennt, oder benachbart vorliegen [239]. Sie interagieren mit G-Proteingekoppelten Chemokinrezeptoren die 7 Transmembrandomänen besitzen [240]. Viele verschiedene Zelltypen können Chemokine freisetzen, die dazu dienen Zellen der angeborenen Immunität zu Infektionsherden zu lenken [2]. Nach ihrer Aktivierung erwerben T-Zellen neue Chemokinrezeptoren, wenn sie sich zu Gedächtnis- oder Effektor-Zellen entwickeln [241].

Inflammatorische Chemokine werden in entzündetem Gebiet von ortsständigen und infiltrierenden Zellen durch Stimulation proinflammatorischer Zytokine oder während des Kontaktes mit pathogenen Agenzien exprimiert [242]. Es konnte gezeigt werden, dass Th1 Zellen, die aus Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA extrahiert wurden, vorwiegend CXCR3 und CCR5 exprimieren. Nach Loetscher et al. [243] wird in Absenz von IL-2 und im Zuge der Aktivierung durch Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper CCR5 herunterreguliert und resultiert in einem Verlust der Zellmigration. Th1 Zellen exprimieren zusätzlich CCR6, während CCR3, CCR4, CCR8 und der Prostaglandin-D₂-Rezeptor CRTh2 von Th2 Zellen exprimiert werden [244]. Singh et al. [245] fanden heraus, dass nahezu alle IL-17-produzierenden T-Zellen unabhängig davon, ob die Th17-Zellen durch in vitro Polarisation generiert, oder aus peripherem Blut isoliert wurden, CCR6 exprimieren. Die Hochregulierung und stabile Expression von CCR6 scheint ein fundamentales Merkmal in der Th17 Differenzierung zu sein und erhöht gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, dass die Blockierung von CCR6 einen Beitrag in der Behandlung von Gewebedefekten leistet, verursacht durch IL-17 produzierende T-Zellen.

Durch MSCs war die Expression von CCR6 und CXCR3 in beiden isolierten Zellfraktionen herabgesetzt

Die Chemokinrezeptorexpression von CCR6 und CXCR3 war in beiden isolierten Zellfraktionen bei gesunden Probanden und Patienten durch MSCs herabgesetzt. Unter den drei erfassten Chemokinrezeptoren war CCR5 insgesamt am schwächsten ausgeprägt. Gleichzeitig konnte in der Naiven Zellfraktion bei Patienten keine Minderung der CCR5 Ausprägung durch MSCs erkannt werden. Bei gesunden Probanden der Naiven Fraktion und in der Nicht-Naiven Fraktion war eine Herabsetzung der CCR5 Ausprägung dagegen zu beobachten.

Es muss jedoch betont werden, dass MSCs die CCR5 Ausprägung im Vergleich zu CCR6 und CXCR3 nur unwesentlich beeinflusste.

Erst kürzlich untersuchten Naaldijk et al. [130] den immunmodulatorischen Effekt transplan-
tierter MSCs in transgenetischen Mäusen, die humanes Amyloid Precursor Protein (APP) und
Presenilin-1 (PS1) exprimieren und konnten unter MSCs-Einfluss keine Veränderung der
CCR5 Ausprägung feststellen. In einer Studie von 2015 erforschten Robles et al [155] die
Wirkung von MSCs auf die Graft-versus-host-Krankheit im Mausmodell und stellten eine
supprimierte Expression der Rezeptoren CCR5 und CXCR3 durch Applikation von MSCs fest.

Neben der Inhibition der Differenzierung Naiver CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th17 Zellen durch
MSCs, wurde in den Experimenten auch eine geringere CCR6-Expression in beiden isolierten
T-Zell Fraktionen in Gegenwart von MSCs erwartet. Einer Studie von Ghannam et al. [145]
entsprechend, verhinderten MSCs die Induktion der CCR6-Expression im Verlauf der T-Zell-
Differenzierung. Jedoch konnten Eljaafari et al. [206] belegen, dass die Interaktion zwischen
MSCs und PBMCs die Aktivierung und Expansion von Th17 Zellen über Caspase-1 Aktivierung
fördert.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss mesenchymaler Stammzellen (MSC) auf verschiedene T-Zellsubpopulationen *in vitro* untersucht. Dazu wurden Naive- und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen aus humanen PBMCs von gesunden Probanden und Patienten mit Autoimmun-Arthritis bei rheumatischen Erkrankungen isoliert und im Beisein/in Abwesenheit von MSCs unter Th-17-polarisierenden Bedingungen kultiviert. Nach einer 6 Tage umfassenden Inkubationszeit erfolgte die flowzytometrische Bestimmung des Phänotyps, der Proliferation, der Apoptose, des Zytokinprofils und der Chemokinrezeptorexpression Naiver und Nicht-Naiver-CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs.

Die Phänotypen wurden als CD45RA⁺CD27⁺ Naive-, CD45RA⁻CD27⁺ Gedächtnis-, CD45RA⁻CD27⁻ Effektor- und CD45RA⁺CD27⁻ TEMRA-Zellen definiert und ihre jeweiligen prozentualen Anteile an allen CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Nach Beurteilung der Proliferation und Apoptose, erfolgte die Analyse der IFN γ -, IL-17-, IL-9- und IL-13-Produktion für jeden der vier Phänotypen. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil an FoxP3⁺CD25⁺CD127⁻ Tregs und deren IL-10-Produktion bestimmt. Abschließend erfolgte die Messung der CCR5-, CCR6- und CXCR3-Expression.

Insgesamt konnte sowohl in der Naiven CD4⁺- als auch in der Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellfraktion eine Hemmung der Proliferation und Apoptose CD4⁺ T-Zellen durch MSCs gemessen werden. Zudem supprimierten MSCs die Produktion der Zytokine IFN γ , IL-17, IL-9 und IL-10 und steigerten teilweise die Produktion von antiinflammatorischem IL-13.

In den vier untersuchten Phänotypen verhielt sich die Zytokinproduktion variabel und war bei CD45RA⁻CD27⁺ Gedächtnis- und CD45RA⁻CD27⁻ Effektor-Zellen am größten. Der hemmende Einfluss der MSCs war auf diese beiden Phänotypen ebenfalls am stärksten ausgeprägt.

CD45RA⁺CD27⁺ Naive- und CD45RA⁺CD27⁻ TEMRA-Zellen produzierten in Kultur mit MSCs mitunter vermehrt proinflammatorische Zytokine. Analog zur Proliferation und Apoptose verminderten MSCs die Expression von CCR5, CCR6 und CXCR3 auf CD4⁺ T-Zellen. Die beschriebenen Effekte der MSCs konnten sowohl bei gesunden Probanden, als auch bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen nachgewiesen werden. Durch die Verwendung eines

Transwell®-Systems konnte gezeigt werden, dass MSCs ihre Wirkung auf T-Lymphozyten nicht nur durch direkten Zell-Zell-Kontakt, sondern auch über lösliche Faktoren ausüben.

Die Resultate dieser Arbeit verdeutlichen den immunsuppressiven Charakter der MSCs auf Naive und Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen unter Th17-polarisierenden Bedingungen in vitro. Jedoch zeigt die Analyse der Zytokinproduktion in den untersuchten T-Zell-Phänotypen, dass MSCs neben ihrer immunsuppressiven Eigenschaft die Zytokinantwort einzelner T-Zellphänotypen steigern können. MSCs scheinen daher am ehesten eine immunmodulatorische Rolle zu spielen, indem sie übersteigerte Immunreaktionen herabsetzen und bei Bedarf immunstimulierend wirken.

Summary

In this thesis the influence of mesenchymal stem cells (MSCs) on different T cell subsets was investigated in vitro. Naive- and Non-Naive CD4⁺ T cells were isolated from human PBMCs of healthy donors and patients with rheumatic diseases and cultured in presence/in absence of MSCs under Th17 polarizing conditions. After incubation for six days phenotype, proliferation, apoptosis, cytokine profile and expression of chemokine receptors of Naive- and Non-Naive CD4⁺ T cells in presence/in absence of MSCs was determined by flow cytometry. T cell subsets were defined as CD45RA⁺CD27⁺ Naive, CD45RA⁺CD27⁺ Memory, CD45RA⁺CD27⁺ Effector and CD45RA⁺CD27⁺ TEMRA cells and the percentage of total CD4⁺ T cells was calculated. After assessing proliferation and apoptosis, production of IFN γ , IL-17, IL-9 and IL-13 was analyzed for each of the four subsets. Additionally, the percentages of FoxP3⁺CD25⁺CD127⁺ Tregs and the corresponding production of IL-10 were determined. Finally, the expression of chemokine receptors CCR5, CCR6 and CXCR3 was measured.

In both the Naive and Non-Naive CD4⁺ cell fraction an inhibition of proliferation and apoptosis of CD4⁺ T cells through MSCs was analyzed.

Moreover, MSCs suppressed the production of the cytokines IFN γ , IL-17, IL-9 and IL-10 and partially enhanced the production of IL-13. The cytokine production varied in the four analyzed T cell subsets, with the highest cytokine production among CD45RA⁺CD27⁺ Memory and CD45RA⁺CD27⁺ Effector cells. The inhibiting influence of MSCs on these two subsets was most prominent.

CD45RA⁺CD27⁺ Naive and CD45RA⁺CD27⁻ TEMRA cells occasionally produced more proinflammatory cytokines in culture with MSCs. Like similar effects of MSCs on proliferation and apoptosis, MSCs diminished the expression of CCR5, CCR6 and CXCR3 on CD4⁺ T cells. The effects of MSCs were demonstrated in both, healthy donors and patients with rheumatic diseases. By the use of a Transwell®-System it was shown that MSCs exert their effects not only through direct cell-cell-contact but also by soluble factors.

The results of this thesis elucidate the immunosuppressive character of MSCs on Naive and Non-Naive CD4⁺ T cells under Th17-polarizing conditions in vitro. However, the analysis of the cytokine production in the investigated T cell subsets showed, that MSCs are able to enhance the immune response besides their immunosuppressive properties. Therefore, MSCs most likely seem to play an immunomodulatory role, by reducing exaggerated immune reactions and, if required are also able to act immune stimulating.

7. Literaturverzeichnis

1. Wahren-Herlenius, M. and T. Dorner, *Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease*. Lancet, 2013. **382**(9894): p. 819-31.
2. Murphy, K.M., et al., *Janeway Immunologie*. 7 ed. 2009: Spektrum Akademischer Verlag. 1092 Seiten.
3. Bosselut, R., *CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 529-40.
4. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
5. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
6. Honda, K., *IL-22 from T cells: better late than never*. Immunity, 2012. **37**(6): p. 952-4.
7. Schmitt, N. and H. Ueno, *Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines*. Curr Opin Immunol, 2015. **34**: p. 130-6.
8. Croft, M., L.M. Bradley, and S.L. Swain, *Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells*. J Immunol, 1994. **152**(6): p. 2675-85.
9. Kaplan, M.H., M.M. Hufford, and M.R. Olson, *The development and in vivo function of T helper 9 cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(5): p. 295-307.
10. Luqman, M. and K. Bottomly, *Activation requirements for CD4+ T cells differing in CD45R expression*. J Immunol, 1992. **149**(7): p. 2300-6.
11. Dalchau, R. and J.W. Fabre, *Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen. Evidence for structural and possible functional diversity of the human leukocyte common molecule*. J Exp Med, 1981. **153**(4): p. 753-65.
12. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
13. Larbi, A. and T. Fulop, *From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality*. Cytometry A, 2014. **85**(1): p. 25-35.
14. De Jong, R., et al., *The CD27- subset of peripheral blood memory CD4+ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo*. Eur J Immunol, 1992. **22**(4): p. 993-9.
15. Serriari, N.E., et al., *B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on CMV-specific T cells during infection and regulates their function*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3140-8.
16. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
17. Perez, V.L., et al., *Stability of Th1 and Th2 populations*. Int Immunol, 1995. **7**(5): p. 869-75.
18. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.

19. Fossiez, F., et al., *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2593-603.
20. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
21. Koenen, H.J., et al., *Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2340-52.
22. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
23. Cosmi, L., et al., *T helper cells plasticity in inflammation*. Cytometry A, 2014. **85**(1): p. 36-42.
24. Jager, A. and V.K. Kuchroo, *Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation*. Scand J Immunol, 2010. **72**(3): p. 173-84.
25. Goldblatt, F. and S.G. O'Neill, *Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases*. Lancet, 2013. **382**(9894): p. 797-808.
26. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 429-42.
27. Picerno, V., et al., *One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(4): p. 551-8.
28. Silman, A.J. and J.E. Pearson, *Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S265-72.
29. Del Puente, A., et al., *High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians*. Am J Epidemiol, 1989. **129**(6): p. 1170-8.
30. Silman, A.J., et al., *Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study*. Br J Rheumatol, 1993. **32**(10): p. 903-7.
31. Yamamoto, K., et al., *Genetic studies of rheumatoid arthritis*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2015. **91**(8): p. 410-22.
32. Schamboeck, A., et al., *Organization of the transcriptional unit of a human class II histocompatibility antigen: HLA-DR heavy chain*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(24): p. 8663-75.
33. Accolla, R.S., et al., *MHC: orchestrating the immune response*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 8-11.
34. Janeway CA Jr, Travers P, and Walport M, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition ed. 2001, New York.
35. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
36. Stastny, P., *Association of the B-Cell Alloantigen DRw4 with Rheumatoid Arthritis*. New England Journal of Medicine, 1978. **298**(16): p. 869-871.
37. Taneja, V., *Cytokines pre-determined by genetic factors are involved in pathogenesis of Rheumatoid arthritis*. Cytokine, 2015. **75**(2): p. 216-21.
38. Smolen, J.S., D. Aletaha, and I.B. McInnes, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2016.
39. Smolen, J.S., et al., *New therapies for treatment of rheumatoid arthritis*. Lancet, 2007. **370**(9602): p. 1861-74.
40. Janossy, G., et al., *Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation*. Lancet, 1981. **2**(8251): p. 839-42.
41. Harris, E.D., Jr., *Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy*. N Engl J Med, 1990. **322**(18): p. 1277-89.

42. Pratt, A.G., J.D. Isaacs, and D.L. Matthey, *Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2009. **23**(1): p. 37-48.
43. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-793.
44. Chabaud, M., et al., *Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(5): p. 963-70.
45. Chabaud, M., et al., *Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 409-14.
46. Zampeli, E., P.G. Vlachoyiannopoulos, and A.G. Tzioufas, *Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum*. J Autoimmun, 2015. **65**: p. 1-18.
47. Aletaha, D., F. Alasti, and J.S. Smolen, *Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 229.
48. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
49. Schellekens, G.A., et al., *Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 273-81.
50. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 380-6.
51. Ioan-Facsinay, A., et al., *Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a collection of anti-citrullinated protein antibodies and contain overlapping and non-overlapping reactivities*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(1): p. 188-93.
52. Boissier, M.C., et al., *Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction*. J Autoimmun, 2012. **39**(3): p. 222-8.
53. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
54. Prevoo, M.L., et al., *Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(1): p. 44-8.
55. van der Heijde, D.M., et al., *Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score*. Ann Rheum Dis, 1990. **49**(11): p. 916-20.
56. Wolfe, F., *Comparative usefulness of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1997. **24**(8): p. 1477-85.
57. Smolen, J.S., et al., *Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(4): p. 631-7.
58. *A comparison of prednisolone with aspirin or other analgesics in the treatment of rheumatoid arthritis. A second report by the joint committee of the Medical Research Council and Nuffield Foundation on clinical trials of cortisone, ACTH, and other therapeutic measures in chronic rheumatic diseases*. Ann Rheum Dis, 1960. **19**: p. 331-7.
59. Saag, K.G., et al., *Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events*. Am J Med, 1994. **96**(2): p. 115-23.

60. Kay, J. and R. Westhovens, *Methotrexate: the gold standard without standardisation*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(7): p. 1081-2.
61. Tanaka, Y., *Current concepts in the management of rheumatoid arthritis*. Korean J Intern Med, 2016. **31**(2): p. 210-8.
62. Elliott, M.J., et al., *Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis*. Lancet, 1994. **344**(8930): p. 1105-10.
63. Edwards, J.C., et al., *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2572-81.
64. Hamel, K., et al., *Suppression of proteoglycan-induced arthritis by anti-CD20 B Cell depletion therapy is mediated by reduction in autoantibodies and CD4+ T cell reactivity*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4994-5003.
65. Sano, H., et al., *Coexpression of phosphotyrosine-containing proteins, platelet-derived growth factor-B, and fibroblast growth factor-1 in situ in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and Lewis rats with adjuvant or streptococcal cell wall arthritis*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 553-65.
66. Augello, A., et al., *Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(4): p. 1175-86.
67. Akiyama, K., et al., *Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(5): p. 544-55.
68. Choi, E.W., *Adult stem cell therapy for autoimmune disease*. Int J Stem Cells, 2009. **2**(2): p. 122-8.
69. Gonzalez, M.A., et al., *Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p. 1006-19.
70. Gonzalez-Rey, E., et al., *Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(1): p. 241-8.
71. Wang, Q., G. Ding, and X. Xu, *Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells and possible mechanisms*. Histol Histopathol, 2016: p. 11750.
72. Wang, L., Y. Zhao, and S. Shi, *Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration*. J Dent Res, 2012. **91**(11): p. 1003-10.
73. Mareschi, K., et al., *Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta*. Exp Hematol, 2016. **44**(2): p. 138-150.e1.
74. Liu, Q., et al., *Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8(+)CD28(-) regulatory T cells*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(6): p. 708-18.
75. Duffy, M.M., et al., *Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor*. Eur J Immunol, 2011. **41**(10): p. 2840-51.
76. Braun, J. and J. Sieper, *Ankylosing spondylitis*. Lancet, 2007. **369**(9570): p. 1379-90.
77. Feldtkeller, E., et al., *Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis*. Rheumatol Int, 2003. **23**(2): p. 61-6.
78. Stolwijk, C., et al., *Global Prevalence of Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2016. **68**(9): p. 1320-31.

79. de, B.J., A. Polman, and B.-M. de, *Hereditary factors in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 1961. **20**: p. 215-20.
80. Pedersen, O.B., et al., *Ankylosing spondylitis in Danish and Norwegian twins: occurrence and the relative importance of genetic vs. environmental effectors in disease causation*. Scand J Rheumatol, 2008. **37**(2): p. 120-6.
81. Asquith, M. and J.T. Rosenbaum, *The interaction between host genetics and the microbiome in the pathogenesis of spondyloarthropathies*. Curr Opin Rheumatol, 2016. **28**(4): p. 405-12.
82. Dougados, M. and D. Baeten, *Spondyloarthritis*. Lancet, 2011. **377**(9783): p. 2127-37.
83. Schlosstein, L., et al., *High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis*. N Engl J Med, 1973. **288**(14): p. 704-6.
84. Brewerton, D.A., et al., *Ankylosing spondylitis and HL-A 27*. Lancet, 1973. **1**(7809): p. 904-7.
85. Brown, M.A., *Genetics of ankylosing spondylitis*. Curr Opin Rheumatol, 2010. **22**(2): p. 126-32.
86. Smith, J.A., E. Marker-Hermann, and R.A. Colbert, *Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. **20**(3): p. 571-91.
87. Benjamin, R. and P. Parham, *Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis*. Immunol Today, 1990. **11**(4): p. 137-42.
88. Braun, J., et al., *Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(4): p. 499-505.
89. Shen, H., J.C. Goodall, and J.S. Hill Gaston, *Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(6): p. 1647-56.
90. van der Linden, S., H.A. Valkenburg, and A. Cats, *Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria*. Arthritis Rheum, 1984. **27**(4): p. 361-8.
91. Dougados, M., et al., *The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(10): p. 1218-27.
92. Zochling, J., *Measures of symptoms and disease status in ankylosing spondylitis: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS), Ankylosing Spondylitis Quality of Life Scale (ASQoL), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), Bath Ankylosing Spondylitis Global Score (BAS-G), Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), Dougados Functional Index (DFI), and Health Assessment Questionnaire for the Spondylarthropathies (HAQ-S)*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2011. **63 Suppl 11**: p. S47-58.
93. Zochling, J., et al., *ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(4): p. 442-52.
94. Baeten, D., et al., *Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2013. **382**(9906): p. 1705-13.
95. Sieper, J., *Developments in therapies for spondyloarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(5): p. 280-7.

96. Xie, Z., et al., *Differential Expression Profiles of Long Noncoding RNA and mRNA of Osteogenically Differentiated Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis*. J Rheumatol, 2016.
97. Li, D., et al., *All-Trans Retinoic Acid Improves the Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on the Treatment of Ankylosing Spondylitis: An In Vitro Study*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 484528.
98. Wu, Y., et al., *Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4+CCR6+ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(1): p. R29.
99. Wang, P., et al., *Effects and safety of allogenic mesenchymal stem cell intravenous infusion in active ankylosing spondylitis patients who failed NSAIDs: a 20-week clinical trial*. Cell Transplant, 2014. **23**(10): p. 1293-303.
100. James, J.A., et al., *Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(5): p. 1122-6.
101. Pons-Estel, G.J., et al., *Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 2010. **39**(4): p. 257-68.
102. Lisnevskaja, L., G. Murphy, and D. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. Lancet, 2014. **384**(9957): p. 1878-88.
103. Gottschalk, T.A., E. Tsantikos, and M.L. Hibbs, *Pathogenic Inflammation and Its Therapeutic Targeting in Systemic Lupus Erythematosus*. Front Immunol, 2015. **6**.
104. Klarquist, J., et al., *Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus: From Pathogenic Players to Therapeutic Tools*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 5045248.
105. Rahman, A. and D.A. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2008. **358**(9): p. 929-39.
106. Ziemer, M., L. Milkova, and M. Kunz, *Lupus erythematosus. Part II: clinical picture, diagnosis and treatment*. J Dtsch Dermatol Ges, 2014. **12**(4): p. 285-301; quiz 302.
107. Wenzel, J., S. Zahn, and T. Tuting, *Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets*. Lupus, 2010. **19**(9): p. 1020-8.
108. Kleinert, S., M. Feuchtenberger, and H.P. Tony, *[Systemic lupus erythematosus. A problem based approach]*. Internist (Berl), 2010. **51**(8): p. 1013-26; quiz 1027-8.
109. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
110. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
111. Croyle, L. and E.F. Morand, *Optimizing the use of existing therapies in lupus*. Int J Rheum Dis, 2015. **18**(2): p. 129-37.
112. Jordan, N., P.M. Lutalo, and D.P. D'Cruz, *Novel therapeutic agents in clinical development for systemic lupus erythematosus*. BMC Medicine, 2013. **11**(1): p. 1-11.
113. Mount, G.R. and W.R. Gilliland, *Emerging biological therapies in systemic lupus erythematosus*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(1): p. 167-71.
114. Sun, L., et al., *Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans*. Stem Cells, 2009. **27**(6): p. 1421-32.
115. Togel, F.E. and C. Westenfelder, *Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for AKI*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(3): p. 179-83.

116. Bhartiya, D., *Are Mesenchymal Cells Indeed Pluripotent Stem Cells or Just Stromal Cells? OCT-4 and VSELs Biology Has Led to Better Understanding*. Stem Cells Int, 2013. **2013**: p. 547501.
117. Maleki, M., et al., *Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells*. Int J Stem Cells, 2014. **7**(2): p. 118-26.
118. Rossant, J., *Stem Cells from the Mammalian Blastocyst*. STEM CELLS, 2001. **19**(6): p. 477-482.
119. Bernardo, M.E., F. Locatelli, and W.E. Fibbe, *Mesenchymal stromal cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1176**: p. 101-17.
120. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
121. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, Il, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-90.
122. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
123. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
124. Chen, X., M.A. Armstrong, and G. Li, *Mesenchymal stem cells in immunoregulation*. Immunol Cell Biol, 2006. **84**(5): p. 413-21.
125. Pountos, I. and P.V. Giannoudis, *Biology of mesenchymal stem cells*. Injury, 2005. **36 Suppl 3**: p. S8-s12.
126. Bruder, S.P., D.J. Fink, and A.I. Caplan, *Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy*. J Cell Biochem, 1994. **56**(3): p. 283-94.
127. Tanaka, Y., *Human mesenchymal stem cells as a tool for joint repair in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(4 Suppl 92): p. S58-62.
128. Liang, J. and L. Sun, *Mesenchymal stem cells transplantation for systemic lupus erythematosus*. Int J Rheum Dis, 2015. **18**(2): p. 164-71.
129. Wong, R.S., *Role of stem cells in spondyloarthritis: Pathogenesis, treatment and complications*. Hum Immunol, 2015. **76**(10): p. 781-8.
130. Naaldijk, Y., et al., *Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2016.
131. Zappia, E., et al., *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1755-61.
132. Glenn, J.D., et al., *Mesenchymal stem cells differentially modulate effector CD8+ T cell subsets and exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis*. Stem Cells, 2014. **32**(10): p. 2744-55.
133. Darlington, P.J., et al., *Reciprocal Th1 and Th17 regulation by mesenchymal stem cells: Implication for multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2010. **68**(4): p. 540-5.
134. Resnick, I.B., et al., *Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC)*. Am J Blood Res, 2013. **3**(3): p. 225-38.
135. Bernardo, M.E., et al., *Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(2): p. 200-7.

136. Boumaza, I., et al., *Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia.* J Autoimmun, 2009. **32**(1): p. 33-42.
137. Orihara, K., et al., *What's new in asthma pathophysiology and immunopathology?* Expert Rev Respir Med, 2010. **4**(5): p. 605-29.
138. Racz, G.Z., et al., *Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis.* J Physiol Pharmacol, 2014. **65**(3): p. 327-39.
139. Flores, A.I., et al., *Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: A promising therapeutic strategy?* World J Stem Cells, 2015. **7**(2): p. 343-51.
140. Ng, J., J. Bernhard, and G. Vunjak-Novakovic, *Mesenchymal Stem Cells for Osteochondral Tissue Engineering.* Methods Mol Biol, 2016. **1416**: p. 35-54.
141. Sun, Z., S. Wang, and R.C. Zhao, *The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment.* J Hematol Oncol, 2014. **7**: p. 14.
142. Krampera, M., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide.* Blood, 2003. **101**(9): p. 3722-9.
143. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.* Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
144. Qu, X., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion.* Exp Hematol, 2012. **40**(9): p. 761-70.
145. Ghannam, S., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype.* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 302-12.
146. Duffy, M.M., et al., *Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways.* Stem Cell Res Ther, 2011. **2**(4): p. 34.
147. Bartholomew, A., et al., *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.* Exp Hematol, 2002. **30**(1): p. 42-8.
148. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
149. Carrion, F., et al., *Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation.* Immunol Lett, 2011. **135**(1-2): p. 10-6.
150. Hsu, S.C., et al., *Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4+ CD45RO+ T cells.* Immunobiology, 2013. **218**(1): p. 90-5.
151. Cuerquis, J., et al., *Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation.* Cytotherapy, 2014. **16**(2): p. 191-202.
152. Wang, Y., et al., *Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications.* Nat Immunol, 2014. **15**(11): p. 1009-16.
153. Benvenuto, F., et al., *Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state.* Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1753-60.
154. Glenn, J.D. and K.A. Whartenby, *Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy.* World J Stem Cells, 2014. **6**(5): p. 526-39.

155. Robles, J.D., et al., *Immunosuppressive mechanisms of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells in BALB/c host graft versus host disease murine models*. Exp Hematol Oncol, 2015. **4**: p. 13.
156. Najar, M., et al., *The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network*. J Immunother, 2016. **39**(2): p. 45-59.
157. Svobodova, E., et al., *The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(6): p. 901-10.
158. Ren, S., et al., *Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells promote interleukin-17 production from human peripheral blood mononuclear cells of healthy donors and systemic lupus erythematosus patients*. Clin Exp Immunol, 2016. **183**(3): p. 389-96.
159. Laranjeira, P., et al., *Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 3.
160. Dotterweich, J., et al., *The KISS1 Receptor as an In Vivo Microenvironment Imaging Biomarker of Multiple Myeloma Bone Disease*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155087.
161. Boll, I., Heller, S., *Praktische Blutzell Diagnostik*. 1 ed. 1991: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. XXII, 503.
162. Lin, Z., et al., *In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells*. Nat Protoc, 2014. **9**(7): p. 1563-77.
163. Smagur, A., et al., *Impact of different dimethyl sulfoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells*. Vox Sang, 2013. **104**(3): p. 240-7.
164. Firma Miltenyi Biotec. *MACS Technology MicroBeads, Basic principle*. Available from: http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/macs-technology/microbeads_dp.aspx Stand: 01.03.2016.
165. Firma Miltenyi Biotec. *Data Sheet CD4+ T-Cell Isolation Kit (human)*. Available from: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001900/IM0001983.ashx?force=1> Stand: 01.03.2016.
166. Firma Miltenyi Biotec. *Data Sheet Naive CD4+ T-Cell Isolation Kit II (human)*. Available from: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001700/IM0001743.ashx?force=1> Stand: 01.03.2016.
167. Zhang, M., et al., *Role of fractalkine/CX3CR1 interaction in light-induced photoreceptor degeneration through regulating retinal microglial activation and migration*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35446.
168. June, C.H., et al., *The B7 and CD28 receptor families*. Immunol Today, 1994. **15**(7): p. 321-31.
169. Riddell, S.R. and P.D. Greenberg, *The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells*. J Immunol Methods, 1990. **128**(2): p. 189-201.
170. Firma BD Biosciences, *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, Manual Part Number: 11-11032-01, April, 2000*. Kalifornien, USA.
171. Altmeyer, P. and V. Paech. *Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin*. 2010; Available from: <http://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/artikel?id=14768> Stand: 22.03.2016.

172. Misumi, Y., et al., *Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1986. **261**(24): p. 11398-403.
173. Chatila, T., et al., *Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin*. J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1283-9.
174. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
175. Jiang, L., et al., *Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry*. Nat Protoc, 2016. **11**(4): p. 655-63.
176. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch; 263., neu bearbeitete und erweiterte Auflage*. 2012: De Gruyter.
177. Aletaha, D. and J.S. Smolen, *Joint damage in rheumatoid arthritis progresses in remission according to the Disease Activity Score in 28 joints and is driven by residual swollen joints*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(12): p. 3702-11.
178. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
179. Di Mitri, D., et al., *Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2093-100.
180. Batorov, E.V., et al., *Mesenchymal stromal cells improve early lymphocyte recovery and T cell reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with malignant lymphomas*. Cell Immunol, 2015. **297**(2): p. 80-6.
181. Aksu, A.E., et al., *Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats*. Clin Immunol, 2008. **127**(3): p. 348-58.
182. Lim, J.H., et al., *Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4022-9.
183. Tobin, L.M., et al., *Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease*. Clin Exp Immunol, 2013. **172**(2): p. 333-48.
184. Tse, W.T., et al., *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation*. Transplantation, 2003. **75**(3): p. 389-97.
185. Carrade Holt, D.D., et al., *Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(11): p. 1258-65.
186. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. The Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-1441.
187. Najar, M., et al., *Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6*. Cytotherapy, 2009. **11**(5): p. 570-83.
188. Bocelli-Tyndall, C., et al., *Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(8): p. 1352-9.
189. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4619-21.

190. Benkhoucha, M., et al., *Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6424-9.
191. Chen, P.M., et al., *Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(2): p. 295-303.
192. Sioud, M., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins*. Int J Oncol, 2011. **38**(2): p. 385-90.
193. Chen, L., et al., *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1886.
194. Nasef, A., et al., *Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells*. Gene Expr, 2007. **13**(4-5): p. 217-26.
195. Xu, G., et al., *The Role of IL-6 in Inhibition of Lymphocyte Apoptosis by Mesenchymal Stem Cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **361**(3): p. 745-750.
196. Glennie, S., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2821-7.
197. Ramasamy, R., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth*. Leukemia, 2007. **21**(2): p. 304-10.
198. Plumas, J., et al., *Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells*. Leukemia, 2005. **19**(9): p. 1597-604.
199. Li, Y., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells suppressing activation of allogeneic cytokine-induced killer/natural killer cells either by direct or indirect interaction*. Cell Biol Int, 2015. **39**(4): p. 435-45.
200. Luz-Crawford, P., et al., *Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45272.
201. Lee, J.J., et al., *CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function*. Purinergic Signal, 2014. **10**(2): p. 357-65.
202. Chen, Q.Q., et al., *Mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis by modulating inflammatory and autoimmune responses*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(29): p. 4702-17.
203. Li, W., et al., *Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses*. Cell Death Differ, 2012. **19**(9): p. 1505-13.
204. Ren, G., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 141-50.
205. Wang, W.B., et al., *Interleukin-25 Mediates Transcriptional Control of PD-L1 via STAT3 in Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells (hMSCs) to Suppress Th17 Responses*. Stem Cell Reports, 2015. **5**(3): p. 392-404.
206. Eljaafari, A., et al., *Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(7): p. 2147-57.
207. Guo, Z., et al., *Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2840-9.

208. Chan, J.L., et al., *Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4817-24.
209. Hultner, L., et al., *In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5556-63.
210. Gessner, A., H. Blum, and M. Rollinghoff, *Differential regulation of IL-9-expression after infection with Leishmania major in susceptible and resistant mice*. Immunobiology, 1993. **189**(5): p. 419-35.
211. Monteiro, M., et al., *IL-9 Expression by Invariant NKT Cells Is Not Imprinted during Thymic Development*. J Immunol, 2015. **195**(7): p. 3463-71.
212. Jones, C.P., et al., *Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(4): p. 1000-10.e3.
213. Nowak, E.C., et al., *IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease*. J Exp Med, 2009. **206**(8): p. 1653-60.
214. Eller, K., et al., *IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 83-91.
215. Wilhelm, C., et al., *An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation*. Nat Immunol, 2011. **12**(11): p. 1071-7.
216. Visekruna, A., et al., *Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation*. Eur J Immunol, 2013. **43**(3): p. 606-18.
217. Noelle, R.J. and E.C. Nowak, *Cellular sources and immune functions of interleukin-9*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 683-7.
218. Elyaman, W., et al., *IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12885-90.
219. Ciccia, F., et al., *Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2015. **54**(12): p. 2264-72.
220. Pianta, S., et al., *Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets*. Stem Cell Rev, 2015. **11**(3): p. 394-407.
221. de Waal Malefyt, R., et al., *Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells*. Int Immunol, 1995. **7**(9): p. 1405-16.
222. Bellinghausen, I., et al., *Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6*. Immunology, 2003. **108**(2): p. 167-76.
223. Minty, A., et al., *Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 248-50.
224. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
225. Hoornaert, C.J., et al., *In vivo IL13-primed macrophages contribute to reduced alloantigen-specific T cell activation and prolong immunological survival of allogeneic mesenchymal stem cell implants*. Stem Cells, 2016.
226. de Vries, J.E., *The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(2): p. 165-9.

227. Khatri, M., et al., *Porcine lung mesenchymal stromal cells possess differentiation and immunoregulatory properties*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 222.
228. Kavanagh, H. and B.P. Mahon, *Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells*. Allergy, 2011. **66**(4): p. 523-31.
229. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
230. Hunter, C.A., et al., *IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 1997. **158**(7): p. 3311-6.
231. Kawano, H., et al., *IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma*. Int Immunol, 2016. **28**(10): p. 489-501.
232. Gomes, J.A., et al., *Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease*. Hum Immunol, 2014. **75**(1): p. 20-8.
233. Kulcsar, K.A. and D.E. Griffin, *T cell-derived interleukin-10 is an important regulator of the Th17 response during lethal alphavirus encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2016. **295-296**: p. 60-7.
234. Zhou, H., et al., *Differential IL-10 production by DCs determines the distinct adjuvant effects of LPS and PTX in EAE induction*. Eur J Immunol, 2014. **44**(5): p. 1352-62.
235. Baglaenko, Y., et al., *Suppression of autoimmunity by CD5(+) IL-10-producing B cells in lupus-prone mice*. Genes Immun, 2015. **16**(5): p. 311-20.
236. Mehrotra, P.T., et al., *Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2637-44.
237. Burchfield, J.S., et al., *Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction*. Circ Res, 2008. **103**(2): p. 203-11.
238. Pourgholaminejad, A., et al., *The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells*. Cytokine, 2016. **85**: p. 51-60.
239. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 675-705.
240. Caterina, M.J. and P.N. Devreotes, *Molecular insights into eukaryotic chemotaxis*. Faseb j, 1991. **5**(15): p. 3078-85.
241. Sallusto, F., et al., *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 875-83.
242. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
243. Loetscher, P., et al., *CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 344-5.
244. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 639-46.
245. Singh, S.P., et al., *Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 214-21.

8. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-amino-actinomycin D
ACCP	Antizyklische citrullinierte Peptide
ACLE	Akut-kutaner Lupus erythematodes
ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptide
ACR	engl. American College of Rheumatology
ANA	Antikörpern gegen nukleäre Antigene
ANGPT1	Angiopoietin 1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cy7
APP	Humanes amyloid precursor protein
AS	Ankylosierende Spondylitis
ASDAS	engl. Ankylosing Disease Activity Score
ASQoL	engl. Ankylosing Spondylitis Quality of Life Scale
ATRA	All-Trans Retinsäure
BALF	Bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit
BAS-G	engl. Bath Ankylosing Spondylitis Global Score
BASDAI	engl. Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASMI	engl. Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index
BC	engl. Buffy coat
BFA	Brefeldin A
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BV	Brilliant Violet
CCR	Chemokinrezeptorexpression
CD	engl. Cluster of differentiation
CDLE	Chronisch diskoider Lupus erythematodes
CRP	C-reaktives Protein
CSIF	engl. Cytokine synthesis inhibitory factor
DAS	engl. Disease Activity Score
DFI	engl. Dougados Functional Index
DMARDs	Krankheitsmodifizierende Antirheumatika
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	engl. Epidermal growth factor
EPO	Erythropoetin
EULAR	engl. European League Against Rheumatism
FACS	engl. Fluorescence-activated cell scanning
FCS	Fetales Kälber Serum
FITS	Fluoreszein Isothiocyanat
FoxP3	engl. Forkhead-Box-Protein P3
FSC	engl. Forward-Scatter
G-CSF	engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GvHD	engl. Graft-versus-Host-Disease
Gy	engl. Gray
HAQ-S	engl. Health Assessment Questionnaire for the Spondylarthropathies

HD	engl. Healthy donors
HGF	engl. Hepatocyte growth factor
HLA	engl. Human Leukocyte Antigen
HVG	engl. Host-versus-Graft
ICLE	Intermittierender kutaner Lupus erythematoses
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon γ
IGF-1	engl. Insulin-like growth factor 1
IgM-RF	IgM-Rheumafaktor
IL	Interleukin
iTregs	Induzierte regulatorische T-Zellen
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
KGF	engl. Keratinocyte growth factor
LEP	Lupus erythematoses profundus
lncRNA	engl. Long noncoding RNA
MACS®	engl. Magnetic Activated Cell Sorting
Max	Maximum
MHC	engl. Major histocompatibility complex
Min	Minimum
MIP-1	engl. Macrophage inflammatory protein 1
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
nTregs	Natürliche regulatorische T-Zellen
Pat	Patienten
PBS	engl. Phosphate buffered saline
PD-L1	engl. Programmed death ligand-1
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PGE2	Prostaglandin E2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PS1	Presenilin-1
RA	Rheumatoide Arthritis
RORC	engl. RAR-related orphan receptor C
ROR γ t	engl. RAR-related orphan receptor γ t
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
SA	Spondylitis Ankylosans
SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematoses
SD	Standardabweichung
SDF1	engl. Stromal derived factor-1
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SMAD	engl. Small mother against decapentaplegic
SOCS	engl. Suppressor of cytokine signaling
SSC	engl. Sideways-Scatter
STAT	engl. Signal Transducers and Activators of Transcription
T-bet	engl. T-box protein expressed in T cells
TCR	T-Zell-Rezeptor

TEMRA	engl. Terminally differentiated effector memory CD45RA ⁺ T cells
Tfh	Follikuläre T-Helferzelle
Th	T-Helferzellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	Regulatorische T-Zelle
VEGF- α	engl. Vascular endothelial growth factor α
vs	versus

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Einfluss des Zytokinmilieus auf die Differenzierung von T-Helferzellen (modifiziert nach [9]).....	2
Abbildung 2 Vollblutprobe und Ficoll <i>vor</i> und <i>nach</i> Zentrifugation mit typischer Schichtung (modifiziert nach [162]).....	35
Abbildung 3 Funktionsprinzip der Magnetic Activated Cell Separation (MACS®) (modifiziert nach [164])	37
Abbildung 4 Schema der einzelnen Isolierungsschritte zur Gewinnung Naiver- und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen und APCs (Antigenpräsentierende Zellen).	38
Abbildung 5 Flowzytometrische Bestimmung der Reinheit CD45RA ⁺ CD27 ⁺ Naiver CD4 ⁺ T-Zellen.	40
Abbildung 6 Konfiguration der Wells. Well 1-4 enthalten T-Zellen (Naive CD4 ⁺ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen) gesunder Probanden sowie antigenpräsentierende Zellen (APC). Well 3 und 4 enthalten zusätzlich MSCs. Well 5-8 beinhalten T-Zellen (Naive CD4 ⁺ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen) von Patienten.	42
Abbildung 7 Well mit Transwell®. (modifiziert nach [167]).....	43
Abbildung 8 Technischer Ablauf der flowzytometrischen Analyse (modifiziert nach [171])..	46
Abbildung 9 Laserstreulicht beim Auftreffen auf eine Zelle (modifiziert nach [170]).....	47
Abbildung 10 Gezeigt sind 8 unterschiedlich konfigurierte Wells. In Well 1-4 befinden sich Naive CD4 ⁺ T-Zellen und MSC in Co-Kultur. Die Wells 2-4 werden unterschiedlich stimuliert. In Well 5 befinden sich nur MSCs, die mit einem Th17-Cocktail stimuliert werden. Well 6-8 dienen als Kontrollwells und enthalten Naive CD4 ⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Stimuli..	54
Abbildung 12 Gezeigt sind jeweils 4 unterschiedlich konfigurierte Wells einer 48- und einer 96-Well-Platte. In der 48- und der 96-Well-Platte sind Well 7 und 8 jeweils doppelt angelegt und weisen unterschiedliche Zellzahlen auf (jeweils in Runden Klammern () dargestellt).....	57
Abbildung 13 Gezeigt sind 10 unterschiedlich konfigurierte Wells. Die Wells 3, 7, 8, 9 und 10 enthalten neben Naiven CD4 ⁺ T-Zellen (Naive) auch antigenpräsentierende Zellen (APCs)...	58
Abbildung 14 Dargestellt ist der hohe Anteil toter CD4 ⁺ T-Zellen ohne antigenpräsentierende Zellen (APC-) und der gesteigerte Anteil CD4 ⁺ T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen (APC+).....	59

Abbildung 15 Gezeigt sind 10 unterschiedlich konfigurierte Wells. Die Wells 1-5 enthalten MSCs. Die Wells 6-10 enthalten keine MSCs. Die Wells 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 und 10 enthalten antigenpräsentierende Zellen (APCs).....	59
Abbildung 16 Gezeigt sind 12 unterschiedlich konfigurierte Wells. Well 2 enthält Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Naive) und MSCs. Well 1 ist das korrespondierende Kontrollwell von Well 2. Well 4 enthält Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen (Nicht-Naive) und MSCs. Das korrespondierende Kontrollwell von Well 4 ist Well 3. In Well 7 und 8 wird die Co-Kultur (Well 2 und Well 4) durch ein Transwell®-System (T) ersetzt. Well 5 entspricht Well 1 und Well 6 entspricht Well 3. Well 5 und Well 6 enthalten doppelte Zellzahlen. Nach 6 Tagen Inkubationszeit aufteilen von Well 5 und erneute Inkubation für 6 Tage mit MSCs in einem Co-Kultur- (Well 9) und einem Transwell®-System (Well 10). Mit Well 6 wurde analog verfahren. Alle Wells enthalten antigenpräsentierende Zellen (APCs).....	63
Abbildung 17 Durchschnittlicher prozentualer Anteil CD4 ⁺ T-Zellen in Naiver (A)/Nicht-Naiver (B) Fraktion ± Standardfehler des Mittelwertes. Veranschaulicht sind die unterschiedlichen Phänotypen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, und Effektor-Zellen) ausgehend von Naiven CD4 ⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen (B) nach 6 Tagen Th17 Stimulation im Beisein/in Abwesenheit (MSC+/MSC-) von MSCs.	79
Abbildung 18 Lichtmikroskopische Aufnahme Naiver CD4 ⁺ T-Zellen in Kultur <i>mit</i> MSCs in (A) und <i>ohne</i> MSCs in (B)	80
Abbildung 19 Durchschnittlicher prozentualer Anteil Ki-67 ⁺ Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (B) bei Patienten und gesunden Spendern ± Standardfehler des Mittelwertes.....	82
Abbildung 20 Durchschnittlicher prozentualer Anteil Annexin V ⁺ 7AAD ⁻ frühapoptotischer Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (B) bei Patienten und gesunden Spendern ± Standardfehler des Mittelwertes	84
Abbildung 21 Durchschnittlicher prozentuale Anteil spätapoptotischer Annexin V ⁺ 7AAD ⁺ Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (A) und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (B) bei Patienten und gesunden Spendern ± Standardfehler des Mittelwertes.....	86
Abbildung 22 Durchschnittliche prozentuale IFN γ -Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4 ⁺ T-Zellen	87
Abbildung 23 Durchschnittliche prozentuale IL-17-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4 ⁺ T-Zellen	88
Abbildung 24 Durchschnittliche prozentuale IL-9-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4 ⁺ T-Zellen	89

Abbildung 25 Repräsentative FACS-Plots für die Zytokinproduktion CD4 ⁺ T-Zellen eines Patienten nach Th17 Stimulation. Die Zahlenwerte im rechten oberen Bereich der FACS-Plots geben die prozentuale Anteile der IL-17 ⁺ , IL-9 ⁺ , IL-17 ⁺ /IL-9 ⁺ und IL-17 ⁺ /IL-9 ⁻ CD4 ⁺ T-Zellen in der Naiven Fraktion wieder.....	90
Abbildung 26 Durchschnittliche prozentuale IL-13-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4 ⁺ T-Zellen	93
Abbildung 27 Durchschnittliche prozentuale IL-10-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in Tregs bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Naiven CD4 ⁺ T-Zellen.....	94
Abbildung 28 Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 exprimierender CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes ausgehend von Naiven CD4 ⁺ T-Zellen	96
Abbildung 29 Durchschnittliche prozentuale IFN γ -Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen.....	97
Abbildung 30 Durchschnittliche prozentuale IL-17-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen.....	98
Abbildung 31 Durchschnittliche prozentuale IL-9-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen.....	99
Abbildung 32 Repräsentative FACS-Plots für die Zytokinproduktion CD4 ⁺ T-Zellen eines Patienten nach Th17 Stimulation. Die Zahlenwerte im rechten oberen Bereich der FACS-Plots geben die prozentuale Anteile der IL-17 ⁺ , IL-9 ⁺ , IL-17 ⁺ /IL-9 ⁺ und IL-17 ⁺ /IL-9 ⁻ CD4 ⁺ T-Zellen in der Nicht-Naiven Fraktion wieder.	100
Abbildung 33 Durchschnittliche prozentuale IL-13-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in den gezeigten Subpopulationen bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen.....	103
Abbildung 34 Durchschnittliche prozentuale IL-10-Produktion CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes in Tregs bei Patienten und gesunden Probanden, ausgehend von isolierten Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen	104
Abbildung 35 Durchschnittlicher prozentualer Anteil CCR5, CCR6 und CXCR3 exprimierender CD4 ⁺ T-Zellen ± Standardfehler des Mittelwertes, ausgehend von Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen.	106

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zytokine Th-17 Polarisation	21
Tabelle 2: T-Zell Stimulantien	22
Tabelle 3: Kits zur T-Zellisolierung	22
Tabelle 4: Antikörper extra- und intrazelluläre Färbung	22
Tabelle 5: Pufferlösungen und Trennmedien	24
Tabelle 6: Gebrauchsfertige Pufferlösungen, Nähr- und Trennmedien	25
Tabelle 7: Zellkulturmedium MSCs	25
Tabelle 8: Zellkulturmedium T-Zellen	26
Tabelle 9: Instrumentarium und Geräte	26
Tabelle 10: Software	28
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 12: Ein- und Ausschlusskriterien Patienten	31
Tabelle 13: Ein- und Ausschlusskriterien gesunde Probanden	32
Tabelle 14: Ein- und Ausschlusskriterien MSC-Spender	33
Tabelle 15: Färbepanel zur Bestimmung der Reinheit Naiver CD4 ⁺ T-Zellen und Nicht-Naive T-Zellen.	40
Tabelle 16: Verwendete Zellzahlen T-Zellen, APCs und MSCs	42
Tabelle 17: Th17 Cocktail zur Polarisierung Naiver und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen in Richtung Th17 Zellen	44
Tabelle 18: Kostimulation zur Aktivierung Naiver und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen	44
Tabelle 19: Phänotypisierung der T-Zell Subpopulationen anhand der Oberflächenantigene CD45RA und CD27	48
Tabelle 20: Verwendete Stimuli vor Immunfluoreszenzfärbung	49
Tabelle 21: Extra- und Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung	52

Tabelle 22: Übersicht Etablierungsversuche	70
Tabelle 23: Eigenschaften der Patienten.....	72
Tabelle 25: Charakteristik der MSC-Spender	74
Tabelle 26: Phänotypisierung Naive CD4 ⁺ T-Zellen von <i>Gesunden</i> mit/ohne MSCs.....	75
Tabelle 27: Phänotypisierung Naive CD4 ⁺ T-Zellen von <i>Patienten</i> mit/ohne MSCs	76
Tabelle 28: Phänotypisierung Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen von <i>Gesunden</i> mit/ohne MSCs	77
Tabelle 29: Phänotypisierung Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen von <i>Patienten</i> mit/ohne MSCs	78
Tabelle 30: Messung der Proliferation durch Ki-67 bei Naiven und Nicht-Naiven CD4 ⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs	81
Tabelle 31: Apoptosefrühstadium Naiver und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs...	83
Tabelle 32: Apoptosespätstadium Naiver und Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs...	85
Tabelle 33: Zytokinproduktion Naiver CD4 ⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs in gesunden Probanden.....	91
Tabelle 34: Zytokinproduktion Naiver CD4 ⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSCs	92
Tabelle 35: Chemokinrezeptorexpression Naive CD4 ⁺ T-Zellen gesunder Probanden mit/ohne MSC	95
Tabelle 36: Chemokinrezeptorexpression Naive CD4 ⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSC	96
Tabelle 37: Zytokinproduktion Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen gesunder Probanden mit/ohne MSCs.....	101
Tabelle 38: Zytokinproduktion Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSCs.....	102
Tabelle 39: Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen gesunder Probanden mit/ohne MSC	105
Tabelle 40: Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen von Patienten mit/ohne MSC	106
Tabelle 41: Übersicht Ergebnisse der Hauptversuche.....	108
Tabelle 42: Etablierungsversuch 2 - Anteil CD4 ⁺ T-Zellen in den Wells 1-8.....	151

Tabelle 43: Etablierungsversuch 3 - Anteil proliferierender Ki-67 positiver CD4 ⁺ T-Zellen in den Wells 1-8	152
Tabelle 44: Etablierungsversuch 4 - Anteil proliferierender Ki-67 positiver CD4 ⁺ T-Zellen in den Wells 7 und 8.....	153
Tabelle 45: Etablierungsversuch 5 - Anteil proliferierender Ki-67 positiver CD4 ⁺ T-Zellen in den Wells 1-10	154
Tabelle 46: Etablierungsversuche 6-10 – Phänotypisierung Naiver CD4 ⁺ T-Zellen.....	155
Tabelle 47: Etablierungsversuche 6-10 - Anteil Ki-67 positiver Naiver CD4 ⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs.....	155
Tabelle 48: Etablierungsversuche 6-10 - Apoptose Naiver CD4 ⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs ...	156
Tabelle 49: Etablierungsversuche 6-10 – Zytokinproduktion CD4 ⁺ T-Zellen in den Wells 1-10.....	156
Tabelle 50: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit).....	157
Tabelle 51: Etablierungsversuche 11 und 12 - Anteil Ki-67 positiver Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	158
Tabelle 52: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	159
Tabelle 53: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	160
Tabelle 54: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	161
Tabelle 55: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	162
Tabelle 56: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	163
Tabelle 57: Etablierungsversuche 11 und 12 - Proliferation Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	164
Tabelle 58: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	165
Tabelle 59: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	166

Tabelle 60: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	167
Tabelle 61: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)	168
Tabelle 62: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	169
Tabelle 63: Etablierungsversuche 11 und 12 - Proliferation Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	170
Tabelle 64: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	170
Tabelle 65: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	171
Tabelle 66: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	172
Tabelle 67: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	173
Tabelle 68: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	174
Tabelle 69: Etablierungsversuche 11 und 12 - Proliferation Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	175
Tabelle 70: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	176
Tabelle 71: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Nicht Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit).....	177
Tabelle 72: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	178
Tabelle 73: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naiver CD4 ⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)	179

11. Anhang

Tabelle 42: Etablierungsversuch 2 - Anteil CD4⁺ T-Zellen in den Wells 1-8

Wells	CD4⁺ T-Zellen in %
Zellzahl Naive T-Zellen: $2,0 \times 10^5$ Zellzahl MSCs: $2,5 \times 10^4$	
Well 1 MSC+ Naive	keine Daten
Well 2 MSC+ Naive + CD3/CD28	0,0
Well 3 MSC+ Naive + CD3/CD28 + Th17	0,2
Well 4 MSC+ Naive + Th17	0,3
Well 5 MSC+ Th17	keine Daten
Well 6 Naive + Th17	0,1
Well 7 Naive + CD3/CD28	0,1
Well 8 Naive + Th17+ CD3/CD28	0,0

Dargestellt sind die prozentualen Anteile lebendiger CD4⁺ T-Zellen, in den einzelnen Wells der in Abbildung 10 gezeigten Zellkultur. Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen; Zellratio: Naive CD4⁺ T-Zellen/MSCs 8:1. Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper; Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Tabelle 43: Etablierungsversuch 3 - Anteil proliferierender Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in den Wells 1-8

Wells	
Zellzahl Naive T-Zellen: $5,0 \times 10^5$	Proliferierende CD4⁺ T-Zellen in %
Zellzahl MSCs: $2,5 \times 10^4$	
Well 1 MSC+ Naive	1,1
Well 2 MSC+ Naive + CD3/CD28	2,7
Well 3 MSC+ Naive + CD3/CD28 + Th17	0,5
Well 4 MSC+ Naive + Th17	0,7
Well 5 MSC+ Th17	keine Daten
Well 6 Naive + Th17	1,0
Well 7 Naive + CD3/CD28	0,2
Well 8 Naive + Th17+ CD3/CD28	0,1

Dargestellt ist der Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in %, in den einzelnen Wells der in Abbildung 10 gezeigten Zellkultur mit veränderter Zellratio. Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen;

Zellratio: Naive CD4⁺ T-Zellen/MSCs 20:1.

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;

Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Tabelle 44: Etablierungsversuch 4 - Anteil proliferierender Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in den Wells 7 und 8

Wells	Proliferierende CD4 ⁺ T-Zellen in %
Well 7 (48-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28	1,7
Zellzahl Naive T-Zellen: 1,0 x 10⁶	
Well 7 (48-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28	1,7
Zellzahl Naive T-Zellen: 0,5 x 10⁶	
Well 8 (48-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28 + Th17	0,5
Zellzahl Naive T-Zellen: 1,0 x 10⁶	
Well 8 (48-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28 + Th17	1,0
Zellzahl Naive T-Zellen: 0,5 x 10⁶	
Well 7 (96-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28	0,0
Zellzahl Naive T-Zellen: 0,1 x 10⁶	
Well 7 (96-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28	keine Daten
Zellzahl Naive T-Zellen: 0,2 x 10⁶	
Well 8 (96-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28 + Th17	0,0
Zellzahl Naive T-Zellen: 0,1 x 10⁶	
Well 8 (96-Well-Platte)	
Naive + CD3/CD28 + Th17	0,2
Zellzahl Naive T-Zellen: 0,2 x 10⁶	

Dargestellt ist der Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in %, in den Wells 7 und 8 der in Abbildung 12 gezeigten Zellkultur. Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen;

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;

Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Tabelle 45: Etablierungsversuch 5 - Anteil proliferierender Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in den Wells 1-10

Wells Zellzahl Naive T-Zellen: $2,5 \times 10^5$ Zellzahl APCs: $2,5 \times 10^5$	Proliferierende CD4⁺ T-Zellen in %
Well 1 Naive	0,0
Well 2 Naive + CD3/CD28	0,1
Well 3 Naive + APCs + CD3/CD28 + Th17	53,8
Well 4 Naive + CD3/CD28 + IL-2	0,0
Well 5 Naive + CD3/CD28 + IL-7	2,6
Well 6 Naive + CD3/CD28 + IL-2 + IL-7	4,3
Well 7 Naive + APCs + CD3/CD28 + IL-2	50,6
Well 8 Naive + APCs + CD3/CD28 + IL-7	54,7
Well 9 Naive + APCs + CD3/CD28 + IL-2 + IL-7	54,9
Well 10 APC	0,0

Dargestellt ist der Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in %, in den Wells 1-10 der in Abbildung 13 gezeigten Zellkultur. Naive = Naive CD4⁺ T-Zellen; APCs = Antigenpräsentierende Zellen; Zellratio Naive CD4⁺ T-Zellen/APCs: 1:1.

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper; Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml). IL-7 = 20ng/ml; IL-2 = 20ng/ml.

Tabelle 46: Etablierungsversuche 6-10 – Phänotypisierung Naiver CD4⁺ T-Zellen

	Naive CD4 ⁺ T-Zellen Mit MSCs			Naive CD4 ⁺ T-Zellen Ohne MSCs			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
Subpopulationen % CD4 ⁺ T-Zellen							
TEMRA CD45RA ⁺ CD27 ⁻	4,7 ± 6,6	1,6	0,2 – 16,3	6,3 ± 7,6	4,7	0,9 – 19,4	0,690
Naive CD45RA ⁺ CD27 ⁺	67,3 ± 13,7	66,9	51,1 – 88,8	35,5 ± 21,6	39,3	7,0 – 61,1	0,016
Gedächtnis CD45RA ⁻ CD27 ⁺	23,1 ± 17,7	26,8	3,0 – 48,2	31,3 ± 27,6	16,3	11,3 – 77,3	0,690
Effektor CD45RA ⁻ CD27 ⁻	4,8 ± 4,0	4,1	0,5 – 11,5	15,8 ± 15,0	11,0	1,4 – 41,1	0,222
Tregs FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	1,5 ± 0,8	1,5	0,7 – 2,7	1,2 ± 1,1	1,1	0,0 – 2,5	0,690

Änderung des Phänotyps isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen aus PBMC gesunder buffy coat Spender im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Subpopulationen an allen CD4⁺ T-Zellen.

Zellratio: Naive CD4⁺ T-Zellen/MSCs: 10:1; Zellratio Naive CD4⁺ T-Zellen/APCs: 5:1.

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;

Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum, Max = Maximum.

p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs vs. Median Subpopulationen in % ohne MSCs.

Tabelle 47: Etablierungsversuche 6-10 - Anteil Ki-67 positiver Naiver CD4⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs

	Proliferation Mit MSC			Proliferation Ohne MSCs			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
Isolierte Fraktion % CD4 ⁺ T-Zellen							
Naive CD4⁺ T-Zellen	24,2 ± 18,8	29,7	0,2 – 45,3	45,7 ± 34,5	43,0	5,7 – 82,2	0,421

Durchschnittlicher Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;

Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs.

Tabelle 48: Etablierungsversuche 6-10 - Apoptose Naiver CD4⁺ T-Zellen mit/ohne MSCs

		Apoptose Mit MSC			Apoptose Ohne MSCs			p-Wert
Isolierte Fraktion		Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen								
Naive CD4 ⁺ T-Zellen		3,6 ± 1,9	3,9	1,0 – 5,7	4,2 ± 3,7	2,8	1,5 – 10,4	1,000

Durchschnittlicher Anteil Annexin V⁺ 7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSC.

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;

Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Annexin V⁺ 7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Annexin V⁺ 7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs.

Tabelle 49: Etablierungsversuche 6-10 – Zytokinproduktion CD4⁺ T-Zellen in den Wells 1-10

	Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
Zytokinproduktion							
% CD4 ⁺ T-Zellen							
IFNγ-Produktion							
TEMRA	0,1 ± 0,2	0,0	0,0 - 0,3	0,6 ± 0,6	0,5	0,1 - 1,5	0,095
Naive	1,3 ± 1,4	1,0	0,0 - 3,3	9,1 ± 11,1	5,0	0,4 - 28,2	0,095
Gedächtnis	0,7 ± 0,7	0,5	0,0 - 1,6	3,3 ± 2,2	4,1	0,3 - 5,8	0,056
Effektor	0,4 ± 0,4	0,3	0,0 - 1,0	1,1 ± 1,1	0,7	0,1 - 2,8	0,151
IL-17-Produktion							
TEMRA	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,1	0,3 ± 0,7	0,0	0,0 - 1,5	0,548
Naive	0,4 ± 0,3	0,5	0,0 - 0,8	0,7 ± 0,7	0,3	0,0 - 1,8	1,000
Gedächtnis	0,2 ± 0,1	0,2	0,0 - 0,3	0,5 ± 0,5	0,3	0,0 - 1,3	0,222
Effektor	0,3 ± 0,4	0,2	0,0 - 1,0	1,4 ± 1,6	1,2	0,0 - 3,9	0,222
IL-10-Produktion							
Tregs	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,3 ± 0,4	0,2	0,0 - 0,8	0,151

Durchschnittliche prozentuale Zytokinproduktion in den Subpopulationen (TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen) ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs.

Zellratio: Naive CD4⁺ T-Zellen/MSCs: 10:1; Zellratio Naive CD4⁺ T-Zellen/APCs: 5:1.

Stimulation: Anti-CD3 = 1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper; Anti-CD28 = 1 µg/ml Anti-CD28-Antikörper;

Th17 = Th17-Cocktail: IL-6 (20ng/ml) + IL-1β (10ng/ml) + IL-23 (100ng/ml) + TGF-β (5ng/ml).

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum, Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs.

Tabelle 50: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Phänotyp	Naive CD4 ⁺ T-Zellen				Naive CD4 ⁺ T-Zellen					
	Mit MSCs				Ohne MSCs					
	Co-Kultur		Transwell®		Kontrolle					
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen										
TEMRA	0,2 ± 0,1	0,2	0,1 - 0,2	0,2 ± 0,1	0,2	0,1 - 0,2	0,5 ± 0,2	0,5	0,3 - 0,6	*0,333
CD45RA ⁺ CD27 ⁻										**0,333
Naive	52,2 ± 11,3	52,2	44,2 - 60,2	54,0 ± 16,8	54,0	42,1 - 65,8	30,9 ± 9,1	30,9	24,4 - 37,3	*0,333
CD45RA ⁺ CD27 ⁺										**0,333
Gedächtnis	45,9 ± 9,2	45,9	39,4 - 52,4	44,3 ± 14,8	44,3	33,8 - 54,8	60,3 ± 3,1	60,3	58,1 - 62,5	*0,333
CD45RA ⁺ CD27 ⁺										**0,333
Effektor	1,8 ± 2,0	1,8	0,4 - 3,2	1,6 ± 1,8	1,6	0,3 - 2,8	8,4 ± 5,6	8,4	4,3 - 12,5	*0,333
CD45RA ⁻ CD27 ⁻										**0,333
Tregs	0,6 ± 0,3	0,6	0,4 - 0,8	0,8 ± 0,1	0,8	0,7 - 0,8	1,3 ± 0,8	1,3	0,7 - 1,9	*1,000
FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻										**1,000

Änderung des Phänotyps isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen aus PBMC gesunder Probanden im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Phänotypen an allen CD4⁺ T-Zellen. Die Tabelle gibt die Auswertung der Etablierungsversuche 11 und 12 wieder.

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum, Max = Maximum.

p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs vs. Median Subpopulationen in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 51: Etablierungsversuche 11 und 12 - Anteil Ki-67 positiver Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

	Proliferation						Proliferation					
	Mit MSCs						Ohne MSCs					
	Co-Kultur			Transwell®			Kontrolle					
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen												
Naive CD4⁺ T-Zellen	38,2 ± 19,7	38,2	24,1 - 52,1	39,3 ± 12,9	39,3	30,2 - 48,4	73,7 ± 6,4	73,7	69,2 - 74,2			*0,333 **0,333

Durchschnittlicher Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 52: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Isolierte Fraktion	Apoptose (nur in Etablierungsversuch 12 bestimmt)					Apoptose Ohne MSCs				
	Mit MSCs					Kontrolle				
	Transwell®					Ohne MSCs				
	Co-Kultur						Transwell®			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen										
Naive CD4 ⁺ T-Zellen	2,0 ± -	2,0	2,0 - 2,0	4,0 ± -	4,0	4,0 - 4,0	1,6 ± -	1,6	1,6 - 1,6	*1,000 **1,000

Durchschnittlicher Anteil Annexin V + 7AAD - CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs.
Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.
p-Werte: Median Annexin V⁺7AAD⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Annexin V⁺7AAD⁺ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle;
**p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle; - = keine Daten.

Tabelle 53: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Zytokinproduktion % CD4 ⁺ T-Zellen	Naive CD4 ⁺ T-Zellen				Naive CD4 ⁺ T-Zellen Ohne MSCs			
	Mit MSCs				Kontrolle			
	Co-Kultur				Transwell®			
	Mean \pm SD	Median	Min - Max	Mean \pm SD	Median	Min - Max	Mean \pm SD	p-Wert
IFNγ-Produktion								
TEMRA	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 \pm 0,0	*1,000 **1,000
Naive	0,3 \pm 0,3	0,3	0,1 - 0,5	0,3 \pm 0,1	0,3	0,2 - 0,4	0,1 \pm 0,0	*0,667 **0,333
Gedächtnis	2,6 \pm 2,8	2,6	0,6 - 4,5	0,7 \pm 0,4	0,7	0,4 - 0,9	2,6 \pm 1,3	*1,000 **0,333
Effektor	0,4 \pm 0,6	0,4	0,0 - 0,8	0,1 \pm 0,1	0,1	0,0 - 0,1	1,3 \pm 1,6	*1,000 **0,333
IL-17-Produktion								
TEMRA	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 \pm 0,0	*1,000 **1,000
Naive	0,2 \pm 0,2	0,2	0,0 - 0,3	0,3 \pm 0,2	0,3	0,1 - 0,4	0,0 \pm 0,0	*0,667 **0,333
Gedächtnis	1,3 \pm 1,3	1,3	0,3 - 2,2	0,3 \pm 0,1	0,3	0,2 - 0,3	0,5 \pm 0,0	*1,000 **0,333
Effektor	0,4 \pm 0,6	0,4	0,0 - 0,8	0,4 \pm 0,4	0,4	0,1 - 0,7	0,4 \pm 0,4	*1,000 **0,333
IL-9-Produktion								
TEMRA	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,1 \pm 0,1	*1,000 **1,000
Naive	0,4 \pm 0,4	0,4	0,1 - 0,6	0,7 \pm 0,8	0,7	0,1 - 1,3	0,4 \pm 0,1	*1,000 **1,000
Gedächtnis	0,6 \pm 0,8	0,6	0,0 - 1,2	1,1 \pm 1,4	1,1	0,1 - 2,1	2,2 \pm 0,4	*0,333 **1,000
Effektor	0,2 \pm 0,2	0,2	0,0 - 0,3	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	1,3 \pm 0,9	*0,333 **0,333

Durchschnittliche prozentuale IFN γ -, IL-17 und IL-9-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 54: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Zytokinproduktion % CD4 ⁺ T-Zellen	Naive CD4 ⁺ T-Zellen					Naive CD4 ⁺ T-Zellen				
	Mit MSCs					Ohne MSCs				
	Co-Kultur					Kontrolle				
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
IL-13-Produktion										
TEMRA	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	*1,000 **1,000
Naive	0,6 ± 0,5	0,6	0,2 - 0,9	1,6 ± 1,9	1,6	0,2 - 2,9	0,5 ± 0,4	0,5	0,2 - 0,7	*0,667 **0,667
Gedächtnis	1,8 ± 2,2	1,8	0,2 - 3,3	2,1 ± 2,5	2,1	0,3 - 3,9	1,0 ± 0,5	1,0	0,6 - 1,3	*1,000 **1,000
Effektor	0,2 ± 0,2	0,2	0,0 - 0,3	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,1	0,9 ± 0,8	0,9	0,3 - 1,4	*0,333 **0,333
IL-10-Produktion										
Tregs	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,3 ± 0,2	0,3	0,1 - 0,4	*0,333 **0,333

Durchschnittliche prozentuale IL-13 und IL-10-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 55: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Chemokinrezeptoren % CD4 ⁺ T-Zellen	Naive CD4 ⁺ T-Zellen Mit MSCs				Naive CD4 ⁺ T-Zellen Ohne MSCs			
	Co-Kultur		Transwell®		Kontrolle			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	p-Wert
CCR5	0,3 ± 0,1	0,3	0,2 - 0,3	0,3 ± 0,1	0,3	0,2 - 0,4	0,3 ± 0,2	*1,000 **0,667
CCR6	1,9 ± 1,7	1,9	0,7 - 3,1	2,6 ± 2,8	2,6	0,6 - 4,6	10,2 ± 1,7	*0,333 **0,333
CXCR3	0,5 ± 0,1	0,5	0,4 - 0,5	0,5 ± 0,1	0,5	0,4 - 0,5	0,1 ± 0,0	*0,333 **0,333

Durchschnittliche prozentuale Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 auf CD4⁺ T-Zellen ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.
p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle;
**p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 56: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Phänotyp % CD4 ⁺ T-Zellen	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen Mit MSCs				Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen Ohne MSCs			
	Co-Kultur		Transwell®		Kontrolle			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	p-Wert
TEMRA	0,7 ± 0,4	0,7	0,4 - 0,9	0,6 ± 0,6	0,6	0,2 - 1,0	0,5 ± 0,6	0,1 - 0,9
CD45RA ⁺ CD27 ⁻								*0,667 **0,667
Naive	20,3 ± 23,0	20,3	4,0 - 36,5	18,1 ± 20,6	18,1	3,5 - 32,7	6,1 ± 4,4	3,0 - 9,2
CD45RA ⁺ CD27 ⁺								*0,667 **0,667
Gedächtnis	66,6 ± 9,2	66,6	60,1 - 73,2	72,3 ± 1,0	72,3	64,5 - 80,0	76,9 ± 4,1	74,0 - 79,8
CD45RA ⁺ CD27 ⁺								*0,333 **1,000
Effektor	12,3 ± 13,2	12,3	2,9 - 21,6	9,0 ± 9,1	9,0	2,6 ± 15,5	16,5 ± 7,9	10,9 - 22,1
CD45RA ⁺ CD27 ⁻								*1,000 **1,000
Tregs	0,7 ± 0,5	0,7	0,3 - 1,0	1,3 ± 0,2	1,3	1,1 - 1,4	1,7 ± 0,5	1,3 ± 2,0
FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻								*0,333 **1,000

Änderung des Phänotyps isolierter Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen aus PBMC gesunder Probanden im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Phänotypen an allen CD4⁺ T-Zellen. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum, Max = Maximum.

p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs vs. Median Subpopulationen in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 57: Etablierungsversuche 11 und 12 - Proliferation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

	Proliferation					Proliferation				
	Mit MSCs					Ohne MSCs				
	Co-Kultur		Transwell®			Kontrolle				
Isolierte Fraktion	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Mean ± SD	Median	Min - Max	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen										
Nicht-Naive	35,7 ± 44,3	35,7	4,3 - 67,0	21,9 ± 9,6	21,9	81,9 ± 8,4	81,9	75,9 - 87,8	75,9 - 87,8	*0,333
CD4 ⁺ T-Zellen										**0,333

Durchschnittlicher Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.
p-Werte: Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Mittelwerte Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 58: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Isolierte Fraktion	Apoptose (nur in Etablierungsversuch 12 bestimmt)						Apoptose			
							Ohne MSCs			
	Mit MSCs			Kontrolle						
	Co-Kultur			Transwell®						
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen										
Nicht-Naive	1,5 ± -	1,5	1,5 - 1,5	3,0 ± -	3,0	3,0 - 3,0	2,0 ± -	2,0	2,0 - 2,0	*1,000
CD4 ⁺ T-Zellen										**1,000

Durchschnittlicher Anteil Annexin V + 7AAD - CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.
p-Werte: Median Annexin V⁺7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs vs. Median Annexin V⁺7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle; - = keine Daten.

Tabelle 59: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Zytokinproduktion	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen					Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen				
	Mit MSCs					Ohne MSCs				
	Co-Kultur		Transwell®			Kontrolle				
	Mean \pm SD	Median	Min - Max	Mean \pm SD	Median	Min - Max	Mean \pm SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen										
IFNγ-Produktion										
TEMRA	0,5 \pm 0,5	0,5	0,1 - 0,8	0,1 \pm 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,3 \pm 0,4	0,3	0,0 - 0,6	*0,667 **1,000
Naive	0,5 \pm 0,4	0,5	0,2 - 0,8	0,3 \pm 0,2	0,3	0,1 - 0,4	0,2 \pm 0,1	0,2	0,1 - 0,2	*0,333 **0,667
Gedächtnis	12,1 \pm 12,3	12,1	3,4 - 20,8	4,5 \pm 1,3	4,5	3,5 - 5,4	19,1 \pm 16,2	19,1	7,6 - 30,5	*1,000 **0,333
Effektor	3,3 \pm 4,4	3,3	0,2 - 6,4	0,6 \pm 0,6	0,6	0,1 - 1,0	5,6 \pm 5,5	5,6	1,7 - 9,5	*1,000 **0,333
IL-17-Produktion										
TEMRA	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0	0,0 - 0,0	*1,000 **1,000
Naive	0,4 \pm 0,5	0,4	0,0 - 0,7	0,2 \pm 0,2	0,2	0,0 - 0,3	0,1 \pm 0,1	0,1	0,0 - 0,1	*0,667 **0,667
Gedächtnis	4,3 \pm 3,0	4,3	2,2 - 6,4	1,4 \pm 0,7	1,4	0,9 - 1,9	5,2 \pm 2,8	5,2	3,2 - 7,2	*1,000 **0,333
Effektor	2,7 \pm 3,3	2,7	0,3 - 5,0	0,4 \pm 0,4	0,4	0,1 - 0,6	2,5 \pm 2,1	2,5	1,0 - 4,0	*1,000 **0,333
IL-9-Produktion										
TEMRA	0,2 \pm 0,3	0,2	0,0 - 0,4	0,1 \pm 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,1 \pm 0,1	0,1	0,0 - 0,2	*0,667 **1,000
Naive	0,3 \pm 0,0	0,3	0,3 - 0,3	0,3 \pm 0,1	0,3	0,2 - 0,3	0,3 \pm 0,1	0,3	0,2 - 0,3	*0,667 **1,000
Gedächtnis	3,3 \pm 4,4	3,3	0,2 - 6,4	1,8 \pm 2,1	1,8	0,3 - 3,3	4,2 \pm 0,5	4,1	3,8 - 4,5	*1,000 **0,333
Effektor	0,9 \pm 1,2	0,9	0,0 - 1,7	0,1 \pm 0,1	0,1	0,0 - 0,2	1,7 \pm 0,0	1,7	1,7 - 1,7	*1,000 **0,333

Durchschnittliche prozentuale IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 60: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen										Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen	
Mit MSCs										Ohne MSCs	
Zytokinproduktion % CD4 ⁺ T-Zellen	Co-Kultur			Transwell®			Kontrolle			p-Wert	
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max		
IL-13-Produktion											
TEMRA	0,3 ± 0,4	0,3	0,0 - 0,5	0,2 ± 0,2	0,2	0,0 - 0,3	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,1	*0,667 **0,667	
Naive	0,3 ± 0,1	0,3	0,2 - 0,4	0,3 ± 0,1	0,3	0,2 - 0,4	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,2	*0,333 **0,333	
Gedächtnis	2,6 ± 3,2	2,6	0,3 - 4,8	1,6 ± 1,6	1,6	0,4 - 2,7	4,0 ± 3,9	4,0	1,2 - 6,7	*1,000 **1,000	
Effektor	1,1 ± 1,5	1,1	0,1 - 2,2	0,4 ± 0,4	0,4	0,1 - 0,7	2,0 ± 1,8	2,0	0,7 - 3,2	*1,000 **0,333	
IL-10-Produktion											
Tregs	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,9 ± 0,7	0,9	0,4 - 1,4	*0,333 **0,333	

Durchschnittliche prozentuale IL-13- und IL-10-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum. p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs vs. Median Zytokinproduktion in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 61: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (6 Tage Inkubationszeit)

Chemokinrezeptoren % CD4 ⁺ T-Zellen	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen					Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen				
	Mit MSCs					Ohne MSCs				
	Co-Kultur		Transwell®			Kontrolle				
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
CCR5	0,7 ± 0,2	0,7	0,5 - 0,8	0,5 ± 0,4	0,5	0,2 - 0,8	0,5 ± 0,4	0,5	0,2 - 0,7	*0,667 **0,667
CCR6	3,0 ± 3,1	3,0	0,8 - 5,2	3,5 ± 4,0	3,5	0,6 - 6,3	10,3 ± 0,2	10,3	10,1 - 10,4	*0,333 **0,333
CXCR3	1,2 ± 0,1	1,2	1,1 - 1,3	1,2 ± 0,8	1,2	0,6 - 1,8	0,6 ± 0,3	0,6	0,4 - 0,8	*0,333 **0,667

Durchschnittliche prozentuale Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 auf CD4⁺ T-Zellen ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen im Beisein/in Abwesenheit von MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert; Kontrolle = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen ohne MSCs. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % ohne MSCs. *p-Wert: Co-Kultur vs. Kontrolle; **p-Wert: Transwell® vs. Kontrolle.

Tabelle 62: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

	Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
Phänotyp	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
% CD4 ⁺ T-Zellen							
TEMRA							
CD45RA ⁺ CD27 ⁻	2,0 ± 0,1	2,0	1,9 - 2,1	2,9 ± 1,6	2,9	1,7 - 4,0	1,000
Naive							
CD45RA ⁺ CD27 ⁺	23,5 ± 0,9	23,5	22,8 - 24,1	30,4 ± 4,3	30,4	27,3 - 33,4	0,333
Gedächtnis							
CD45RA ⁺ CD27 ⁺	69,0 ± 1,6	69,0	67,9 - 70,1	57,8 ± 1,8	57,8	56,5 - 59,0	0,333
Effektor							
CD45RA ⁻ CD27 ⁻	5,6 ± 0,8	5,6	5,0 - 6,1	9,0 ± 4,5	9,0	5,8 - 12,2	1,000
Tregs							
FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	0,3 ± 0,1	0,3	0,2 - 0,4	0,2 ± 0,1	0,2	0,1 - 0,2	0,333

Änderung des Phänotyps isolierter Naiver CD4⁺ T-Zellen aus PBMC gesunder Probanden in einer Co-Kultur/ einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Aufgeführt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der einzelnen Phänotypen an allen CD4⁺ T-Zellen.

Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum, Max = Maximum.

p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Subpopulationen in % mit MSCs im Transwell®-System.

Tabelle 63: Etablierungsversuche 11 und 12 - Proliferation Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

		Proliferation			Proliferation		
		Mit MSCs			Mit MSCs		
		Co-Kultur			Transwell®		
Isolierte Fraktion	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen							
Naive	10,6 ± 0,4	10,6	10,3 - 10,9	13,3 ± 4,1	13,3	10,4 - 16,2	1,000
CD4 ⁺ T-Zellen							

Durchschnittlicher Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert;

SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs im Transwell®-System.

Tabelle 64: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

		Apoptose			Apoptose		
		Mit MSCs			Mit MSCs		
		Co-Kultur			Transwell®		
Isolierte Fraktion	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen							
Naive	1,8 ± 0,3	1,8	1,6 - 2,0	1,8 ± 1,3	1,8	0,8 - 2,7	1,000
CD4 ⁺ T-Zellen							

Durchschnittlicher Anteil Annexin V⁺ 7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert;

SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Annexin V⁺ 7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Annexin V⁺ 7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % im Transwell®-System.

Tabelle 65: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

Zytokin- produktion	Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
IFNγ-Produktion							
TEMRA	0,9 ± 0,4	0,9	0,6 - 1,1	0,3 ± 0,0	0,3	0,3 - 0,3	0,333
Naive	1,8 ± 2,1	1,8	0,3 - 3,3	2,7 ± 3,2	2,7	0,4 - 4,9	1,000
Gedächtnis	3,6 ± 3,1	3,6	1,4 - 5,8	3,0 ± 2,9	3,0	1,0 - 5,1	0,667
Effektor	2,6 ± 2,0	2,6	1,2 - 4,0	2,9 ± 1,6	2,9	1,8 - 4,0	1,000
IL-17-Produktion							
TEMRA	0,2 ± 0,3	0,2	0,0 - 0,4	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,667
Naive	0,5 ± 0,5	0,5	0,1 - 0,8	0,8 ± 0,8	0,8	0,2 - 1,3	1,000
Gedächtnis	0,8 ± 0,1	0,8	0,7 - 0,8	0,5 ± 0,3	0,5	0,3 - 0,7	0,333
Effektor	0,4 ± 0,2	0,4	0,2 - 0,5	0,3 ± 0,4	0,3	0,0 - 0,6	1,000
IL-9-Produktion							
TEMRA	0,6 ± 0,4	0,6	0,3 - 0,9	0,3 ± 0,0	0,3	0,3 - 0,3	0,667
Naive	1,8 ± 2,2	1,8	0,2 - 3,3	2,5 ± 3,1	2,5	0,3 - 4,7	1,000
Gedächtnis	0,9 ± 0,0	0,9	0,9 - 0,9	0,5 ± 0,0	0,5	0,5 - 0,5	0,333
Effektor	0,9 ± 0,2	0,9	0,7 - 1,0	1,0 ± 0,8	1,0	0,4 - 1,6	1,000

Durchschnittliche prozentuale IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektor-Zellen ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert;

SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Zytokinproduktion in % im Transwell®-System.

Tabelle 66: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

Zytokin- produktion	Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
IL-13-Produktion							
TEMRA	0,9 ± 0,1	0,9	0,8 - 1,0	1,2 ± 0,3	1,2	1,0 - 1,4	0,333
Naive	0,4 ± 0,3	0,4	0,2 - 0,6	0,7 ± 0,6	0,7	0,3 - 1,1	1,000
Gedächtnis	0,8 ± 0,5	0,8	0,4 - 1,1	0,6 ± 0,6	0,6	0,2 - 1,0	0,667
Effektor	1,4 ± 0,6	1,4	0,9 - 1,8	1,4 ± 0,6	1,4	0,9 - 1,8	1,000
IL-10-Produktion							
Tregs	0,2 ± 0,1	0,2	0,1 - 0,3	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,2	0,667

Durchschnittliche prozentuale IL-13- und IL-10-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis-, Effektor-Zellen ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert;

SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Zytokinproduktion in % im Transwell®-System.

Tabelle 67: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

Chemokin- rezeptoren	Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
CCR5	1,0 ± 0,4	1,0	0,7 - 1,2	1,0 ± 0,5	1,0	0,6 - 1,3	1,000
CCR6	3,2 ± 1,8	3,2	1,9 - 4,5	3,4 ± 3,1	3,4	1,2 - 5,6	1,000
CXCR3	1,4 ± 0,2	1,4	1,2 - 1,5	1,0 ± 0,5	1,0	0,6 - 1,3	0,667

Durchschnittliche prozentuale Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 auf CD4⁺ T-Zellen ausgehend von Naiven CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % im Transwell®-System.

Tabelle 68: Etablierungsversuche 11 und 12 – Phänotypisierung Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
Phänotyp	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	1,000
% CD4 ⁺ T-Zellen							
TEMRA	3,9 ± 0,8	3,9	3,3 - 4,4	4,9 ± 0,8	4,9	4,3 - 5,5	1,000
CD45RA ⁺ CD27 ⁻							
Naive	12,4 ± 3,0	12,4	10,3 - 14,5	13,8 ± 0,2	13,8	13,6 - 13,9	0,333
CD45RA ⁺ CD27 ⁺							
Gedächtnis	62,8 ± 1,1	62,8	62,0 - 63,6	48,9 ± 3,2	48,9	46,6 - 51,1	0,333
CD45RA ⁺ CD27 ⁺							
Effektor	21,0 ± 1,1	21,0	20,2 - 21,8	32,6 ± 2,2	32,6	31,0 - 34,1	0,333
CD45RA ⁻ CD27 ⁻							

Änderung des Phänotyps isolierter Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen aus PBMC gesunder Probanden in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Subpopulationen in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Subpopulationen in % mit MSCs im Transwell®-System.

Tabelle 69: Etablierungsversuche 11 und 12 - Proliferation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

		Proliferation			Proliferation		
		Mit MSCs			Mit MSCs		
		Co-Kultur			Transwell®		
Isolierte Fraktion	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen							
Nicht-Naive	7,3 ± 0,1	7,3	7,2 - 7,4	7,5 ± 2,3	7,5	5,8 - 9,1	1,000
CD4 ⁺ T-Zellen							

Durchschnittlicher Anteil Ki-67 positiver CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Ki-67⁺ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs im Transwell®-System.

Tabelle 70: Etablierungsversuche 11 und 12 - Apoptose Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

		Apoptose Mit MSCs			Apoptose Mit MSCs		
		Co-Kultur			Transwell®		
Isolierte Fraktion	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	p-Wert
% CD4 ⁺ T-Zellen							
Nicht-Naive	2,5 ± 0,3	2,5	2,3 - 2,7	3,7 ± 1,0	3,7	3,0 - 4,4	0,333
CD4 ⁺ T-Zellen							

Durchschnittlicher Anteil Annexin V⁺ 7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Annexin V⁺7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Annexin V⁺7AAD⁻ CD4⁺ T-Zellen in % im Transwell®-System.

Tabelle 71: Etablierungsversuche 11 und 12 – IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion Nicht Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

Zytokin- produktion	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
IFNγ-Produktion							
TEMRA	2,2 ± 2,5	2,2	0,4 - 3,9	1,9 ± 1,9	1,9	0,5 - 3,2	1,000
Naive	3,8 ± 4,9	3,8	0,3 - 7,2	4,3 ± 5,8	4,3	0,2 - 8,4	1,000
Gedächtnis	14,8 ± 14,5	14,8	4,5 - 25,0	11,1 ± 14,7	11,1	0,7 - 21,5	0,667
Effektor	6,7 ± 3,4	6,7	4,3 - 9,1	7,6 ± 8,0	7,6	1,9 - 13,2	1,000
IL-17-Produktion							
TEMRA	1,4 ± 1,9	1,4	0,0 - 2,7	0,1 ± 0,1	0,1	0,0 - 0,1	0,667
Naive	0,7 ± 0,6	0,7	0,2 - 1,1	0,9 ± 1,3	0,9	0,0 - 1,8	1,000
Gedächtnis	3,2 ± 2,0	3,2	1,8 - 4,6	1,8 ± 2,3	1,8	0,2 - 3,4	0,667
Effektor	1,6 ± 2,0	1,6	0,2 - 3,0	2,2 ± 3,1	2,2	0,0 - 4,4	1,000
IL-9-Produktion							
TEMRA	0,9 ± 0,7	0,9	0,4 - 1,4	1,6 ± 1,3	1,6	0,6 - 2,5	1,000
Naive	0,4 ± 0,1	0,4	0,3 - 0,4	0,6 ± 0,4	0,6	0,3 - 0,8	1,000
Gedächtnis	2,3 ± 0,4	2,3	2,0 - 2,5	2,2 ± 0,4	2,2	1,9 - 2,4	0,667
Effektor	2,7 ± 0,8	2,7	2,1 - 3,2	1,8 ± 0,1	1,8	1,7 - 1,9	0,333

Durchschnittliche prozentuale IFN γ -, IL-17- und IL-9-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektor-Zellen ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen. Vorstimulation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs;

Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Zytokinproduktion in % im Transwell®-System.

Tabelle 72: Etablierungsversuche 11 und 12 – IL-13- und IL-10-Produktion Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

Zytokin- produktion	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max		
IL-13-Produktion							
TEMRA	1,2 ± 0,0	1,2	1,2 - 1,2	1,8 ± 0,1	1,8	1,7 - 1,9	0,333
Naive	0,7 ± 0,1	0,7	0,6 - 0,7	0,8 ± 0,2	0,8	0,6 - 0,9	1,000
Gedächtnis	1,6 ± 1,0	1,6	0,9 - 2,3	1,0 ± 1,1	1,0	0,2 - 1,8	0,667
Effektor	4,0 ± 0,8	4,0	3,4 - 4,5	3,0 ± 2,3	3,0	1,3 - 4,6	1,000
IL-10-Produktion							
Tregs	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,2 ± 0,1	0,2	0,1 - 0,2	0,333

Durchschnittliche prozentuale IL-13- und IL-10-Produktion in den Phänotypen TEMRA-, Naive-, Gedächtnis- und Effektor-Zellen ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Zytokinproduktion in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Zytokinproduktion in % im Transwell®-System.

Tabelle 73: Etablierungsversuche 11 und 12 – Chemokinrezeptorexpression Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen (12 Tage Inkubationszeit)

Chemokin- rezeptoren	Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			Nicht-Naive CD4 ⁺ T-Zellen			p-Wert
	Mit MSCs			Mit MSCs			
	Co-Kultur			Transwell®			
	Mean ± SD	Median	Min - Max	Mean ± SD	Median	Min - Max	
CCR5	1,4 ± 0,6	1,4	1,0 - 1,8	2,5 ± 1,4	2,5	1,5 - 3,5	1,000
CCR6	1,5 ± 0,6	1,5	1,1 - 1,9	1,5 ± 0,3	1,5	1,3 - 1,7	1,000
CXCR3	1,9 ± 0,1	1,9	1,8 - 2,0	3,0 ± 0,4	3,0	2,7 - 3,2	0,333

Durchschnittliche prozentuale Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 auf CD4⁺ T-Zellen ausgehend von Nicht-Naiven CD4⁺ T-Zellen in einer Co-Kultur/einem Transwell®-System nach 12 Tagen Inkubationszeit.

Vorstimulation Nicht-Naiver CD4⁺ T-Zellen für 6 Tage mit Th17-Cocktail und Anti-CD3/CD28; anschließend Stimulation für weitere 6 Tage in Kultur mit MSCs. Co-Kultur = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit MSCs; Transwell® = Nicht-Naive CD4⁺ T-Zellen und MSCs in einem Transwell®-System kultiviert. Mean = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum.

p-Werte: Median Expression Chemokinrezeptoren in % mit MSCs in Co-Kultur vs. Median Expression Chemokinrezeptoren in % im Transwell®-System.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Martina Prelog für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation. Ihre konstruktive Kritik und Anmerkungen trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Die Gelegenheit am 44. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie als Vortragender teilnehmen zu können, war eine zusätzliche Motivation und weckte mein Interesse am zukünftigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Giovanni Almanzar, der mich bei der Arbeit im Labor unermüdlich bei der Durchführung der Experimente unterstützt und gefördert hat. Weiterhin möchte ich mich bei MTA Kerstin Höfner und den MTAs des Rheumalabors für Ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche, angenehme Atmosphäre bedanken. Lisa Weniger danke ich für die anfängliche Mitarbeit bei der Kultivierung von MSCs und Jochen Schreiner für seine vielfachen Ratschläge bei der Labortätigkeit.

Außerdem bedanke ich mich bei den Patienten für die Teilnahme an der Studie und letztlich bei meiner Familie und meiner Freundin Tanja, die mir immer wieder Mut zugesprochen und Rückhalt geboten haben. Meine Promotionsarbeit bearbeitete Teile aus einem Forschungsprojekt, das großzügig von der Deutschen Kinderrheumastiftung finanziell unterstützt wurde, wofür ich mich ausdrücklich bedanken möchte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maximilian Riekert
Geburtsdaten: 18. Januar 1983 in Stuttgart

Weiterbildung

seit November 2016 Assistenzarzt mit Facharztweiterbildung zum Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen am Universitätsklinikum Köln
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie

Schulische Ausbildung/Studium

2010 – 2015 Studium der Humanmedizin
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Staatsexamen Dezember 2015
2005 – 2010 Studium der Zahnmedizin
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Staatsexamen Juni 2010
2004 – 2005 Zahntechnisches Praktikum, Dent-Tec Göppingen
2002 – 2003 Zivildienst, Marienhospital Stuttgart
1993 – 2002 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Stuttgart
1989 – 1993 Grundschule Kemnat, Ostfildern

Famulaturen (jeweils vier Wochen)

2014 Oral and Maxillofacial Surgery
Mount Sinai Hospital New York, USA
2013 Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2013 Neurochirurgie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2012 Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Praktisches Jahr

2014 – 2015
1. Tertial (Innere Medizin): Marienhospital Stuttgart, Lehrklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2. Tertial (Wahlfach): Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
3. Tertial (Chirurgie): Klinikum Bruneck, Lehrklinik der Universität Verona (I)

Promotionen

(in Korrekturphase)

I: Prof. Dr. Philipp Meyer-Marcotty, Kieferorthopädie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
II: Prof. Dr. Martina Prelog, Kinderklinik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

2016 Kongressteilnahme DGRh (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e.V.); Vortrag und Posterpräsentation: "Are mesenchymal stem cells able to control pro-inflammatory T cells?"